

THESIS

GIESSEN

1966

Aus dem Institut für Tierernährung der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. Brune

**Beitrag zur Qualitätsbeurteilung von Fischprotein
unter besonderer Berücksichtigung der
Qualitätsveränderung durch die Trocknungstemperatur**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Esam Kamel Moustafa
aus Alexandria, Ägypten

August 1966

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

Aus dem Institut für Tierernährung
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. Brune

Beitrag zur Qualitätsbeurteilung von Fischprotein
unter besonderer Berücksichtigung der Qualitäts-
veränderung durch die Trocknungstemperatur

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Esam Kamel Moustafa
aus Alexandria, Ägypten

August 1966

Dekan: Professor Dr. H. Brune

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Brune

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hinrichsen

Tag der mündlichen Prüfung: 30. August 1966

Meinem Vater

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1963 bis August 1965 ausgeführt. Die Vorbereitung, Verarbeitung und die Analyse des Rohmaterials erfolgten bei der Firma J.H. W i l h e l m s in Bremerhaven, die biologische Bewertung anhand von Fütterungsversuchen (Ratten) am Institut für Tierernährung der Justus-Liebig Universität in Gießen, die chemische Bewertung (Aminosäureanalysen) am Institut für Biochemie und Technologie der Bundesforschungsanstalt für Fischerei in Hamburg-Altona.

Nach Vollendung meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr.H. B r u n e, der durch sein großzügiges Entgegenkommen mir die Durchführung meiner Dissertation in der Bundesrepublik Deutschland erst ermöglicht hat, meinen ganz besonderen Dank aussprechen, auch dafür, daß ich die biologischen Untersuchungen an seinem Institut durchführen konnte.

Herrn Professor Dr.W. L u d o r f f († 1964) gilt ebenfalls mein Dank für die verständnisvolle Förderung meiner Arbeit, in deren Rahmen ich die chemische Bewertung an seinem Institut ausführen durfte.

Herrn Dr. A n t o n a c o p o u l o s (Bundesforschungsanstalt für Fischerei), von dem die Anregung zu dieser Arbeit stammt, gebührt vor allem mein Dank für sein stets erwiesenes Interesse und dafür, daß er mir jederzeit mit Rat und Tat zur Verfügung stand, insbesondere auch bei der Zusammenstellung und Korrektur der vorliegenden Niederschrift.

Ich möchte auch nicht versäumen, Herrn Dr. W a g e n i t z (Fa. Wilhelms) für seine Unterstützung bei der Beschaffung der Fische und für seine Beratung bei der Vorbereitung und Verarbeitung des Versuchsmaterials meinen besten Dank zu sagen.

Den Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Technologie, besonders Frau Dr. N a u n d o r f, gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und Beratung; dieser Dank gilt in gleichem Sinne den Mitarbeitern des Instituts für Tierernährung.

Die biologische Bewertung (Professor Dr. H. B r u n e) und die chemische Bewertung (Dr. N. A n t o n a c o p o u l o s) erfolgten u.a. im Rahmen von durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft geförderten Forschungsvorhaben.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Übersicht zur Methodik	5
Fragestellung	10
A. Das Versuchsmaterial	12
1. Theoretischer Teil	12
1.1. Der Fisch als Lebens- und Futtermittel . . .	12
1.2. Herstellungsverfahren von Fischprotein- konzentraten	15
1.3. Zusammensetzung der Fischproteinkonzentrate	18
2. Experimenteller Teil	24
2.1. Vorbereitung des Rohmaterials (Kabeljau) .	24
2.2. Verarbeitung (Trocknung) des Untersuchungsmaterial	25
2.3. Die Ausbeute beim Verarbeiten der Fische .	27
2.4. Die chemische Zusammensetzung des Rohmaterials und der Endprodukte	35
2.5. Einfluß der Trocknungstemperatur auf den Fettgehalt	40
B. Die biologische Bewertung des Proteins	43
1. Theoretischer Teil	43
1.1. Feststellung der Gewichtszunahme=PER u. ΔG	43
1.2. Die Stickstoff(N)-Bilanz	44
1.3. Die Verdaulichkeitskoeffizienten	44
1.4. Die biologische Wertigkeit (BW)	45
1.5. Die "net protein utilization" (NPU)	50
1.6. Über die biologischen Bewertungsmaßstäbe .	52
2. Experimenteller Teil	53
2.1. N-Bilanz und Verdaulichkeits-Versuche . .	53
2.2. Der N-freie Versuch	64

2.3. Fehlerquellen bei der Berechnung der BW .	70
2.4. Statistische Auswertung	75
2.5. Einfluß von Ca und P auf ΔG und PER . .	77
2.6. Einfluß der Trocknungstemperatur auf die biologischen Bewertungsmaßstäbe	80
2.7. Diskussion der biologischen Bewertungs- maßstäbe	97
2.8. Zusammenfassung der Ergebnisse der biolo- gischen Bewertung	101
C. Die chemische Bewertung des Proteins	103
1. Theoretischer Teil	103
1.1. Bestimmung des verdaulichen Rohproteins " in vitro " (Der Pepsin-Salzsäure-Wert) .	104
1.2. Bestimmung von essentiellen Aminosäuren zur Bewertung von Proteinen (positive Bewertung)	106
1.3. Bestimmung von nichtessentiellen Aminosäuren (negative Bewertung)	112
1.4. Die Hydrolyse	114
2. Experimenteller Teil	117
2.1. Der Pepsin-Salzsäure-Wert	117
2.2. Bestimmung des Tryptophans	119
2.3. Bestimmung des "verfügbaren Lysins" . . .	133
2.4. Bestimmung des Glycins u.d.Hydroxyprolins	144
2.5. Der Zusammenhang zwischen den Aminosäuren Tryptophan, Glycin und Hydroxyprolin . .	154
2.6. Zusammenfassung der Ergebnisse der chemi- schen Bewertung	163
D. Diskussion der Zusammenhänge zwischen den chemi- schen und den biologischen Bewertungsmaßstäben .	165
1. Vergleich der Pepsin-Salzsäure-Werte mit den biologischen Verdaulichkeitskoeffizienten . .	165
2. Vergleich der chemischen Bewertung durch Bestim- mung von "verfügbarem Lysin" und Tryptophan mit den biologischen Bewertungsmaßstäben BW und N-Bilanz %	170

3. Die Aminosäuren Glycin und Hydroxyprolin und ihre Aussagekraft für die Bewertung der Qualität und Herkunft von Fischmehlen	181
4. Der Gehalt an extrahierbarem bzw. polymerisiertem Fett und der BW	184
E. Zusammenfassung	187
F. Literaturverzeichnis	193

E i n l e i t u n g

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Problem der Qualitätsbeurteilung von Fischproteinen unter besonderer Berücksichtigung der Qualitätsveränderung durch die Trocknungstemperatur.

In der Praxis besteht noch keine klare Differenzierung des Begriffes Fischmehl bzw. Vollfischmehl, u. a. weil die vorhandenen Untersuchungsverfahren in ihrer Aussagekraft noch nicht voll befriedigen. Unter "Fischmehl" schlechthin wird sowohl das aus ganzen Fischen oder/und Fischabfällen hergestellte Produkt verstanden, das nur aus dem sogen. "Preßkuchen" besteht, ohne nachträgliche Zugabe des eingedickten Preßwassers (Soluble). Bestehen die Fischmehle aus Preßkuchen einschließlich den Solubles, werden sie als "Vollfischmehl" bezeichnet, ganz gleich, ob sie aus ganzen Fischen hergestellt sind oder aus bzw. mit Zusatz von Fischabfällen.

Die verschiedenen Fischmehle sind durch einen hohen Gehalt an Proteinen gekennzeichnet, dessen Höhe in erster Linie von der Herkunft des Rohmaterials abhängt. Sie werden hauptsächlich als tierisches Futtermehl verwendet; neuerdings auch für die menschliche Ernährung, besonders in Gebieten mit Unterangebot an proteinreichen Lebensmitteln.

Bei der vorwiegend gebräuchlichen Herstellung von Fischmehlen durch Dampftrocknung wird im allgemeinen eine Trocknungstemperatur zwischen 80°C und 100°C benutzt. Bei der Anwendung des Feuer Trocknungsverfahren liegen die Temperaturen wesentlich höher. Bei der Herstellung von Fischproteinkonzentraten für die menschliche Ernährung betragen die gebräuchlichen Trocknungstemperaturen zumeist 60°C bis 70°C . Besonders für die Herstellung von diätetischen Nahrungsmitteln für Kranke und Kleinkinder sollen nur frische, ausgesuchte Fische verwendet werden.

Unter dem Gesichtspunkt der technisch gebräuchlichen Herstellung erschien es zweckmäßig, für die Versuchsdurchführung Trocknungstemperaturen bis 100° C zu verwenden (Gefriertrocknung, 40° C, 70° C, 100° C), um die dabei auftretenden Qualitätsveränderungen zu erfassen. Als Kontrolle diene jeweils das gefriergetrocknete Material, da sich die Gefriertrocknung auch bei den eigenen Untersuchungen als schonendes Konservierungsverfahren erwiesen hat, bei dem die chemischen und die biologischen Veränderungen weitgehend eingeschränkt sind.

In der vorliegenden Arbeit diene als Untersuchungsmaterial der Kabeljau (*Gadus morhua*) aus dem Fanggebiet Nordsee (März-April 1963). Er wurde für die durchzuführenden Versuche in folgende 3 Aufbereitungsformen unterteilt:

1. Filetanteil
2. Ganzer Fisch
3. Abfallanteil

In dieser Arbeit wird als "Filetmehl" das Produkt bezeichnet, das ausschließlich aus dem Filetanteil des Fisches hergestellt ist.

Unter dem Begriff "Ganzfischmehl" ist das Produkt aus dem ungeköpften Gesamtfisch ohne Eingeweide zu verstehen.

Der Begriff "Abfallmehl" bezeichnet das Produkt aus Fischköpfen, Gräten, Häuten und sonstigen Bestandteilen des Fischkörpers nach Entfernung der Filets.

Die Beurteilungen der Qualitätsveränderungen des Fischproteins wurde auf zwei Wegen vorgenommen und zwar durch:

1. Biologische Untersuchungsverfahren
2. Chemisch - analytische Methoden

Die biologischen Versuche wurden an A l b i n o -

r a t t e n durchgeführt, wobei die Ermittlung der "Protein effeciency ratio" (PER), Stickstoff (N)-Bilanz, Verdaulichkeit, "biologische Wertigkeit" (EW) und "net protein utilization" (NPU) erfolgte.

Die chemisch-analytischen Bestimmungen beschränkten sich auf die Bestimmung der zwei essentiellen Aminosäuren Tryptophan und Lysin (verfügbares Lysin) und die Bestimmung der zwei nicht-essentiellen Aminosäuren Glycin und Hydroxyprolin sowie die Bestimmung der Verdaulichkeit.

Der biologische Wert eines Nahrungs- bzw. Futtermittels ist u. a. von der Zusammensetzung seines Proteins abhängig. Beim Studium von Ergebnissen aus der Literatur, insbesondere beim Vergleich von Tierversuchen mit der Bewertung durch Bestimmung essentieller Aminosäuren ist nicht immer eine gute Übereinstimmung festzustellen. Die Differenzen beruhen sicher u. a. auf den unterschiedlichen Auffassungen über die Eignung der vorgeschlagenen Untersuchungsmethoden. Das gilt sowohl für die biologischen Bestimmungsmethoden (K-Bilanzverfahren, Körperanalyseverfahren, Einsatzgewicht der Ratten usw.), als auch für die Wertbestimmung anhand charakteristischer Aminosäuren (chromatographisch, mikrobiologisch oder chemisch), wie auch z. B. die Frage der geeignetsten Bedingungen für die Hydrolyse (z. B. Verwendung von Druck, Konzentration der Lösungen und Hydrolysemittel). Von Bedeutung ist auch, ob mit Hilfe derartiger Methoden eine Aussage über die Herkunft des Untersuchungsmaterials (Abfallmehl, Ganzfischmehl etc.), bzw. über die Art seiner Verarbeitung (z. B. hoch oder niedrig erhitztes Mehl) möglich erscheint.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch Herstellung eines weitgehend einheitlichen Untersuchungsmaterials und Gegenüberstellung von biologischen und chemischen Methoden der Proteinbewertung festzustellen, welche Aussage einmal mit jeder Methode allein über die

Qualität und die Qualitätsveränderung des jeweiligen Fischprotein gemacht werden kann, zum anderen, ob mit den beiden beschrifteten Wegen eine Übereinstimmung erzielt werden kann. Im Falle von Differenzen wurde versucht, die Ursachen festzustellen.

Übersicht zur Methodik

Die biologischen Untersuchungen beschränken sich in dieser Arbeit auf das klassische Verfahren der biologischen Wertigkeitsbestimmung, die "Thomas-Mitchell Methode". Diese Methode basiert auf der von Folin (1905) erstmals entwickelten Theorie. Folin unterschied in seiner Theorie die N-Ausscheidung aus endogener und aus exogener Herkunft. Thomas (1909) baute darauf eine Methode auf, um die Qualität eines Proteins zu ermitteln. Der Schwerpunkt seiner Versuche war der erwachsene Mensch. Mitchell (1923 - 24) war der erste, der die biologische Wertigkeit des Proteins (BW) an wachsenden Ratten bestimmt hat. Das hat den Vorteil, daß mittels wachsender Tiere die BW für Erhaltung und für Wachstum ermittelt werden kann. Außerdem hat Mitchell die endogene N-Ausscheidung im Kot = Darm-Verlust-Nitrogen (DVN) experimentell bestimmt, was Thomas nicht tat. Mitchell brachte die endogene N-Ausscheidung im Harn = Endogenes-Harn-Nitrogen (EHN) in Beziehung zum Körpergewicht der Ratte und die endogene N-Ausscheidung im Kot (DVN) in Beziehung zur Futtertrockensubstanz-Aufnahme, beide in N-freien Versuchen bestimmt. Columbus (1954) modifizierte die Methode insofern, daß er den DVN auch in Bezug auf das Körpergewicht der Ratte brachte und den Wert $EHN + DVN = NEB$ (Nitrogen-Erhaltungsbedarf) zur Vereinfachung der Berechnung einsetzte. Demzufolge erübrigt sich die Bestimmung des EHN.

Die Folin'sche Theorie und die darauf aufgebaute "Thomas-Mitchell-Methode" wurden in der Literatur von manchen Autoren u. a. Miller und Bender (1955), Müller und Hötzel (1957) heftig angegriffen. Seitdem Schönheimer (1939) und seine Schule

die Theorie des dynamischen N-Gleichgewichts bekanntgaben, wurde die Gültigkeit der BW als wahrer Maßstab für die Qualitätsbeurteilungen von Proteinen bezweifelt. Mitcheil (1955) bewies experimentell unter streng konstanten Versuchsbedingungen nicht nur die Existenz solch endogener N-Ausscheidung, sondern auch ihren Vorteil bei der Aufklärung vieler Probleme im Proteinstoffwechsel und bei Qualitätsbeurteilungen von Proteinen. Z. B. wäre es ohne diese Theorie nicht möglich, die "wahre Verdaulichkeit" eines Proteins "in vivo" zu ermitteln, oder die biologische Wertigkeit eines Proteins für den Erhaltungsbedarf und für das Wachstum zu bestimmen, was durch andere biologische Methoden, wie z.B. den "produktiven Protein Wert" (PPW) nach Hötzel (1958), Müller und Hötzel (1957) (N-Körperanalyse), oder das einfache N-Bilanz Verfahren etc. allein nicht möglich ist. Auch das Körperanalyse-Verfahren nach Miller und Bender (1955) weist gegenüber der BW-Methode keinerlei Vorteile auf. Das ging aus den Arbeiten von Rippon (1958), Tomarelli et al. (1959), Henry und Toothill (1961) und Njaa (1963) hervor. Sie haben experimentell bewiesen, daß das Körperanalyse-Verfahren zu keinem besseren Ergebnis als die BW-Methode führt und es außerdem mit größeren Fehlerquellen, Zeit- und Materialaufwand verbunden ist.

Für die Ermittlung der BW erwies es sich als zweckmäßig, die Höhe des DVN bzw. der NEB in einem N-freien Versuch zu ermitteln. Nach der Ermittlung des DVN war es möglich, aus der "scheinbaren Verdaulichkeit" die "wahre Verdaulichkeit" rechnerisch zu ermitteln.

Die Vorteile der "wahren Verdaulichkeit" liegen darin, daß sie die "in vivo" tatsächlich verdaute N-Menge darstellt und durch sie die NPU nach Block und Mitcheil (1946) errechnet werden kann.

Neben der BW wurden auch die N-Bilanz, die NPU und nicht zuletzt die PER nach O s b o r n et al. (1919) errechnet und als weitere biologische Bewertungsmaßstäbe für das Fischprotein zugrunde gelegt.

Die N-Bilanz % stellt das prozentuale Verhältnis zwischen der im Tierversuch bestimmten N-Bilanz (N-Einnahme - N-Ausscheidung) und der vom Tier während der Versuchsperiode aufgenommenen N-Menge dar.

Die NPU ist von B l o c k und M i t c h e l l (1946) als ein Maßstab für die Proteinqualität vorgeschlagen worden und stellt die reine Ausnutzungsquote eines Proteins dar. Sie ist durch Multiplikation der BW mit der "wahren Verdaulichkeit" zu ermitteln.

Die PER ist ein Maßstab für die erzielte Gewichtszunahme je Einheit des vom Tier aufgenommenen Rohproteins.

Die chemischen Untersuchungen befassen sich mit der Zusammensetzung des Roh- bzw. getrockneten Materials und mit den Methoden für die chemische Bewertung der Proteine. Die Zusammensetzung wurde nach der sogen. "Weender-Analyse" bestimmt. Dabei wird der Gehalt an Rohprotein, Rohfett und Rohasche bestimmt und der Gehalt an Kohlenhydraten aus der Differenz zu 100 berechnet. Daneben war es für die Fütterungsversuche erforderlich, den Gesamtfettgehalt und die zwei Hauptbestandteile der Asche, Calcium und Phosphor, zu bestimmen.

Die Rohprotein-Bestimmung erfolgte nach K j e l - d a h l , die Rohfett-Bestimmung nach S o x h l e t und die Gesamtfett-Bestimmung nach W e i l b u l l - S t o l d t . Die Rohasche-Bestimmung erfolgte nach dem üblichen Veraschungsverfahren (wegen der Chloride nicht höher als 550° C). Nach der Veraschung wurde das Calcium manganometrisch, und der Phosphor nach der Methode von G r i c k e und K u r m i e s (s. N e h r i n g 1962) kolorimetrisch bestimmt.

Die chemischen Bewertungsmaßstäbe des Proteins umfassen die Verdaulichkeitsbestimmung "in vitro" (Pepsin-Salzsäure-Wert) sowie die Bestimmung der zwei essentiellen Aminosäuren Tryptophan und "verfügbares Lysin" und der zwei nicht essentiellen Aminosäuren Glycin und Hydroxyprolin.

Nach der "Eck-Aminosäuren-Theorie" von K o f r a n y i (1956) brauchen für die chemisch-analytische Bestimmung der BW nicht alle Aminosäuren eines Proteins bestimmt zu werden. Es genügt die genaue Erfassung derjenigen essentiellen Aminosäure, die nach dem Minimumgesetz den begrenzenden Faktor bildet.

Im Falle des Fischproteins kommt in dieser Hinsicht das Tryptophan in Frage. Es wird in dieser Arbeit nach zwei Methoden bestimmt, und zwar nach S p i e s - C h a m b e r s (1949) und nach W i n k l e r / A n t o n a c o p o u l o s (1963). Bei beiden Methoden erfolgt zuerst eine alkalische Hydrolyse (2n NaOH). Die Bestimmung des Tryptophans beruht auf der Kondensation der Indolgruppe des Tryptophans mit einem Aldehyd, wobei ein Zwischenprodukt entsteht, das durch ein Oxydationsmittel oxydiert wird. Die sich dabei bildenden Färbungen werden kolorimetrisch bestimmt. Anhand von Eichkurven wird jeweils der Gehalt an Tryptophan berechnet. (600 bzw. 570 m μ).

Als weitere Aminosäure wird das Lysin herangezogen. Wie L e a und H a n n a n (1950), H e n r y und K o n (1950), sowie C a r p e n t e r und E l l i n g e r (1955) bewiesen haben, ist das "verfügbare Lysin" (available lysine), und nicht das gesamte Lysin für den Nährwert eines Proteins von Bedeutung. Unter dem "verfügbaren Lysin" ist das Lysin zu verstehen, dessen ϵ -Aminogruppe ungebunden vorliegt. C a r p e n t e r (1955) hat eine Methode für die Bestimmung des "verfügbaren Lysins" entwickelt.

Um dieses Lysin zu erfassen, bediente C a r p e n -
t e r sich der erstmals von S a n g e r (1945)
eingeführten 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzol (FDNB) - Reak-
tion, die die am Aminoende der Peptidkette stehende Ami-
nosäure erfaßt. Nach der Hydrolyse wird das Dinitrophe-
nylderivat ϵ -DNP-Lysin (in Äther unlöslich) durch Äther-
extraktion von den zumeist ätherlöslichen Dinitrophe-
nylderivaten anderer Aminosäuren befreit. Im gelb ge-
färbten Rückstand verbleiben hauptsächlich ϵ -DNP-Lysin
und α -DNP-Arginin. Die Gelbfärbung wird kolorimetrisch
gemessen (A-Wert). Unter Zusatz von Methylcarbonyl-
chlorid ($\text{CH}_3\text{O}-\text{COCl}$) wird das ϵ -DNP-Lysin völlig entfernt,
die noch verbleibende Färbung wird nochmals kolorime-
trisch bestimmt (B-Wert) und von dem ersten Wert in Ab-
zug gebracht. Der Gehalt an "verfügbarem Lysin" wird
anhand einer Eichkurve errechnet.

Das Glycin wurde nach A n t o n a c o p o u l o s
(1957) bestimmt. Das Protein wird dabei zuerst einer
sauren Hydrolyse unterworfen; störende Aminosäuren wer-
den mittels Aktivkohle aus dem Hydrolysat entfernt.
Durch Zusatz von Ninhydrin wird das Glycin zu Formalde-
hyd reduziert, der im statu nascendi abdestilliert wird.
Die durch Reaktion des Formaldehyds mit Chromotropsäure
entstehende Färbung wird kolorimetrisch bestimmt ($570\text{m}\mu$)
und anhand einer Eichkurve auf Glycin bezogen.

Das Hydroxyprolin wurde ebenfalls nach A n t o n a -
c o p o u l o s (1957) bestimmt. Das Hydroxyprolin
wird in Gegenwart von Kupfersulfat in alkalischem Mi-
lieu durch Wasserstoffperoxyd oxydiert. Unter Zusatz
von p-Dimethylaminobenzaldehyd (p-DAB) entsteht in
saurem Medium eine rote Färbung, die kolorimetrisch
bestimmt wird ($570\text{m}\mu$).

F r a g e s t e l l u n g

Folgende Fragen wurden in dieser Arbeit behandelt:

1. Welchen Einfluß hat die Trocknungstemperatur:
 - a) auf die Zusammensetzung (Weender Analyse),
 - b) auf die biologischen Bewertungsmaßstäbe des Proteins,
 - c) auf die chemischen Bewertungsmaßstäbe des Proteins?

Es ging hier unter anderem auch darum, den Bereich der kritischen Trocknungstemperatur zu erfassen und festzustellen, ob dieser Bereich für die drei Fischmehlsorten der gleiche ist.

2. Welcher der verwendeten biologischen Bewertungsmaßstäbe - BW oder N-Bilanz % - eignet sich am besten für die Qualitätsbeurteilung?

3. Eignung der chemischen Bewertungsmaßstäbe:

- a) Die Bestimmung des "verfügbaren Lysins" nach
C a r p e n t e r (1960).

- b) Die Bestimmung des Tryptophans.

Vergleich der Methode nach S p i e s - C h a m -
b e r s mit der Methode nach W i n k l e r
in der Modifikation von A n t o n a c o p o u -
l o s . Unter anderem wurde die Reproduzierbar-
keit und Abhängigkeit jeder Methode von der Kon-
zentration des Tryptophans, von der Hydrolyse und
von der Art des untersuchten Materials überprüft.

- c) Sind mit Hilfe der Bestimmung des Glycins bzw.
des Hydroxyprolins zusätzliche Aussagen über die
Herkunft des Materials möglich?

4. Übereinstimmung der biologischen mit den chemischen
Bewertungsmaßstäben; insbesondere der Verdaulichkeit
"in vivo" mit der "in vitro", der N-Bilanz % bzw. der
BW mit dem Gehalt an Tryptophan bzw. an "verfügbarem
Lysin"

5. Die Frage, ob die Veränderungen im Fettgehalt mit den Qualitätsveränderungen des Mehls parallel gehen, sollte am Rande behandelt werden, da ausführliche Untersuchungen in dieser Richtung außerhalb des Themas dieser Arbeit liegen.

A Das Versuchsmaterial =====

1. Theoretischer Teil

1.1. Der Fisch als Lebens- und Futtermittel

Der Fisch zählt zu den hochwertigen Proteinquellen für die menschliche und tierische Ernährung. Die Qualität kann in gewissen Grenzen unterschiedlich sein, z. B. in Abhängigkeit von Fischart, Jahreszeit, Fanggrund, Ernährungszustand, Größe bzw. Alter der Fische, dabei wird u. a. auch unterschieden zwischen Fett- und Magerfischen.

Die Seefische werden bei der Auktion an den Seefischmärkten durch amtliche Veterinäre, u. a. in Hinblick auf ihren Frischzustand, beurteilt und in Güteklassen (A, B, C) eingestuft. Das geschieht im wesentlichen mit Hilfe organoleptischer Methoden.

Im Jahre 1963/64 betrugen in der BRD die Gesamt-
fischanlandungen der großen und der kleinen Hoch-
see- und der Küstenfischerei etwa 560 000 t, mit
einer Zunahme von etwa 1,5 % gegenüber dem Jahre
1962/63. Die wichtigsten Fischarten waren: Kabel-
jau, Hering, Schellfisch, Seelachs, Rotbarsch und
Krabben. Es ergab sich im Jahre 1963/64 eine An-
landungszunahme für Kabeljau um etwa 11 000 t
(8 %), der seinen Anteil am Gesamtfang von 26,4 %
im Jahre 1962 auf 27,7 % im Jahre 1963 erhöhte
und damit die meist gefangene Fischart blieb
(vgl. Tab. A1).

Tab. A 1: Gesamtanlandungen nach wichtigsten Fischarten^x

Fischart	Anlandungen			
	t		%	
	1963	1962	1963	1962
Hering	119 180	133 792	21,3	24,5
Kabeljau, Dorsch	155 290	144 163	27,7	26,4
Schellfisch	6 485	5 922	1,2	1,1
Seelachs, Köhler	24 681	32 677	4,4	6,0
Rotbarsch	126 407	128 878	22,5	23,6
Krabben und Krebse	42 631	25 395	7,6	4,7
Sonstiges	86 034	74 649	15,3	13,7
Insgesamt	560 698	545 476	100,0	100,0

^xAus dem "Jahres-Bericht" über die Deutsche Fischwirtschaft 1963/64 S. 29.

Tab. A 2: Verwendung des angelandeten Kabeljaus

	t ^x	% ^{xx}
Frische, ganze Fische	89 541	ca 57,5
Frisches Filet	2 053	1,3
Gesalzene Fische	9 062	5,8
Tiefgekühlte Fische o. K.	5 961	3,9
Tiefgekühltes Filet	39 582	25,5
Als Exportware	4 744	3,1
An Fischmehlfabriken	4 308	2,8
Insgesamt	155 251	99,9

^x Aus dem "Jahres-Bericht" über die Deutsche Fischwirtschaft 1963/64 S. 67 - 81.

^{xx} Errechnete Daten

o. K. = ohne Kopf

Aus Tabelle A 2 geht hervor, daß der größte Teil der Anlandungen an Kabeljau als sogenannter Frischfisch durch den Einzelhandel an den Verbraucher geht (etwa 58 %). Der Rest wandert an die Verarbeitungsfabriken. Der Anteil des gesalzenen Kabeljaus geht z. B. von Jahr zu Jahr zurück.

Menge und Art des verarbeiteten Fisches (z. B. gesalzen oder tiefgefroren) richtet sich nach der Nachfrage des Verbrauchers. Besonders der Anteil an tiefgefrorenem Fischfilet steigt von Jahr zu Jahr, um dem Marktbedarf zu entsprechen. Z. Zt. wird etwa 30 % der Anlandung des Kabeljaus tiefgefroren. Nicht abgesetzte Fische oder nicht mehr für den menschlichen Genuß als tauglich eingestufte Ware (2,8 %), wie auch die frischindustriellen Abfälle, wandern zur Weiterverarbeitung für Futterzwecke in die Fischmehlfabriken. Wegen seines niedrigen Fettgehaltes ist der Kabeljau ein bevorzugtes Ausgangsmaterial für die Herstellung von Fischmehlen (geringere Oxydationsempfindlichkeit).

Neuerdings werden aus guter Ware auch Fischmehle bzw. "Fish Flour" für die menschliche Ernährung hergestellt. Das ist besonders bedeutsam für solche Länder, in denen die Bevölkerung aufgrund des feucht-heißen Klimas nicht mit ausreichender Menge der meist leicht-verderblichen proteinreichen Lebensmittel (Fleisch, Fisch) versorgt werden kann. In manchen Gebieten von Afrika, Südost-Asien und Indien, in denen die Bevölkerung nichts gegen den Fischgeruch und -geschmack einzuwenden hat, stellt selbst das normale Fischmehl, unter entsprechend hygienischen Maßnahmen hergestellt, eine billige und wichtige Proteinquelle dar. Auch bei der Bekämpfung von Protein-Mangelerscheinungen, vor allem Kwashiorkor, spielt das Fischmehl bzw.

Fisch Flour eine bedeutsame Rolle. Wegen seines hohen Ca- und P-Gehaltes wird es bei der Bekämpfung mancher Mangelerkrankungskrankheiten bevorzugt, z. B. Ca-Mangelerkrankungen in den Gebieten, wo Mais als Haupt-Kohlenhydratquelle dient.

Für gegen Fischgeruch bzw. Fischgeschmack empfindliche Konsumenten wird das sogenannte "Fish Flour", ein von fischigem Geruch und Geschmack - vor allem durch weitgehende Entfettung - befreites Produkt hergestellt.

1.2. Herstellungsverfahren von Fischproteinkonzentraten

Unter Trocknen wird die Entfernung von Flüssigkeit aus einem Gut durch Verdunsten, Verdampfen oder Sublimieren verstanden, zur Gewinnung eines mehr oder weniger flüssigkeitsfreien Feststoffes [H e i s s (1962)].

In der Fischindustrie hat das Trocknen als physikalisches Konservierungsverfahren eine große Bedeutung. Bei der Herstellung von Fischmehl ist der Flüssigkeitsentzug erforderlich, um das Endprodukt in einen haltbaren Zustand zu überführen. Das nach dem mechanischen Abpressen vom sogenannten Presskuchen abgeschiedene Presswasser wird in seiner eingedickten Form als "Fisch Soluble" direkt verwendet, oder je nach Verwendungszweck zum Fischmehl (Vollfischmehl) zugegeben.

1.2.1. Herstellung von Fischmehl

Zur Fischmehlherstellung wird das zu verarbeitende Material - bei der Auktion nicht abgesetzte oder abgelehnte, nicht marktgeeignete Fische, auch Kleinfische oder anderer Beifang sowie Abfälle der Fischverarbeitung zunächst gekocht. Darauf werden Wasser und Öl entfernt,

zumeist im Presser und in Zentrifugen (Separatoren). Die gepreßte Masse, der sogenannte Preßkuchen, wird zerkleinert und in einer Trocknungsanlage getrocknet. Die Trocknung kann auf verschiedene Art erfolgen: durch trockne heiße Luft (Feuertrockner), durch Dampf (Dampftrockner) oder im Vakuum.

Der Fischpreßsaft (Preßwasser, stick-water) wird nach Abscheidung des Öls eingedickt und kommt als hochwertige "Fisch-solubles" für Futtermittelzwecke zur Verwendung oder wird dem Fischmehl beim Trocknen zugemischt (Vollfischmehl).

Wesentliche Unterschiede in der Qualität der nach verschiedenen Verfahren gewonnenen Fischmehle sollen nach N e h r i n g (1956), sofern die Verarbeitung sorgfältig durchgeführt worden ist, nicht festgestellt worden sein. Es gibt jedoch auch gegenteilige Auffassungen.

O u s t e r h a u t und S n y d e r (1962) vertraten z.B. die Ansicht, daß das Herstellungsverfahren u. a. die Qualität des Fischmehls ganz wesentlich beeinflussen kann.

1.2.2. Herstellung von "Fish Flour"

(Fischmehl für die menschliche Ernährung)

Zur Herstellung von "Fish Flour" wird bisher vor allem das azeotrope Trocknungsverfahren angewendet, wobei das Wasser zusammen mit einem organischen Lösungsmittel (z. B. Dichloromethan oder Hexan) abdestilliert wird. Das Fischfleisch ist dadurch weitgehend entwässert. Danach wird dem getrockneten Fischfleisch das Restfett mit einem anderen organischen Lösungsmittel entzogen. Durch die nahezu quantitative Entfettung ist es möglich, das Endprodukt weitgehend vom Fischgeruch und -geschmack zu

befreien und damit für die menschliche Ernährung nutzbar zu machen. Das trockne Fischfleisch wird zerkleinert, gemahlen und abgefüllt. Dieses Produkt wird als "Fish Flour" oder Fisch-Protein-Konzentrat bezeichnet. Heute setzt sich daneben immer mehr das schonende Gefriertrocknungsverfahren durch.

1.2.3. Das Gefriertrocknungsverfahren

Dieses Trocknungsverfahren hat sich als das schonendste Konservierungsverfahren für Nahrungsmittel erwiesen. Dabei bleiben das Wasserbindungsvermögen, sowie nach dem Regenerieren mit Wasser die ursprünglichen Eigenschaften der Nahrungsmittel weitgehend erhalten als bei der Anwendung der bisher üblichen Trocknungsverfahren.

Das wesentliche Moment bei diesem Verfahren ist, daß dem Gut das Wasser in äußerst kurzer Zeit entzogen wird. Dadurch wird die bei den bisherigen Trocknungsverfahren unumgängliche langsame Konzentrierung der gelösten Stoffe (des Zellinhaltes) weitgehend vermieden, und damit vor allem eine irreversible Denaturierung der Proteine und ein Verlust an Wasserbindungsvermögen. Das wird einmal durch die Anwendung sehr tiefer Temperaturen (bis -70°C), zum anderen durch ein hohes Vakuum (bis 1.10^{-3} Torr) erreicht. Die Entfernung der Feuchtigkeit geschieht dabei praktisch durch Sublimation, d. h. durch unmittelbare Verdampfung von der festen in die dampfförmige Phase. Die Temperatur des Gutes darf dabei den Gefrierpunkt nicht überschreiten. Der einzige Nachteil dieses Verfahrens ist der hohe tech-

nische Aufwand und die damit verbundenen noch relativ hohen Kosten.

1.3. Zusammensetzung der Fischproteinkonzentrate

1.3.1. Zusammensetzung des Fleisches bzw. "Fish Flour"

Aus der folgenden Tabelle A 3 ist zu ersehen, daß der Gehalt an Rohprotein im Fischfleisch bei sämtlichen Literaturangaben nahezu konstant ist. Die Werte sind vom Gehalt an Wasser und Fett abhängig, stimmen jedoch im allgemeinen gut überein, selbst unter Berücksichtigung beeinflussender Faktoren wie z. B. Fanggebiet und Jahreszeit. Aus der Tabelle geht auch hervor, daß das Fleisch des Kabeljaus eine sehr gute Proteinquelle darstellt und daß bei der Verarbeitung kein Verlust am Rohprotein eintritt,

1.3.2. Zusammensetzung des Fischmehls aus Kabeljau

Aus der Tabelle A 4 geht hervor, daß im Gegensatz zum Fischfleisch die Rohproteingehalte in den verschiedenen Fischmehlen des Kabeljaus z. T. sehr weit auseinander liegen. Diese Schwankungen können kaum auf den Ursprung (Fanggebiet, Jahreszeit etc.) des Rohmaterials für die Fischmehlherstellung zurückgeführt werden, dafür sind sie zu groß. Die Ursachen liegen vielmehr einmal in der Zusammensetzung der Rohware für die Verarbeitung, ob z. B. ganze Fische verarbeitet wurden oder Abfälle, oder beide gemischt, zum anderen, ob es sich um ein "sogenanntes Fischmehl" (aus Preßkuchen hergestellt), oder um ein Vollfischmehl (aus Preßkuchen und eingedicktem Preßwasser hergestellt) handelt. Je nach dem Verhältnis von Preßkuchen

Tab. A 3: Zusammensetzung des Fischfleisches (Kabeljau)

	Wasser %	RP %	Fett %	Asche %	Ca mg/ 100g	P mg/ 100g	Literaturangabe
Fisch- fleisch "frisch"	81,8	17,0	0,3	0,99	11	190	Souci, Fachmann u. Kra (19
	80,4	18,0	0,3	1,10	20	200	Cutting (1962)
	0	92,8	1,5	5,60	103	1030	" auf T.S. berechne
	-	14,6	0,6	-	30	220	Geiger u. Borgstrom (196
	81,5	17,9	0,6	1,6	-	-	Stansby (1961)
gefrorenes Filet	81,0	18,13	-	-	-	-	Martem yanova (1958)
getrockne- tes Fleisch "Stockfisch"	15,2	79,2	2,5	3,1	60	450	Souci, Fachmann u. Kra (196
	14,8	72,5	1,4	5,9	160	950	Cutting (1961)
	0	91,3	1,6	6,9	186	1105	" auf T.S. berechne
gefrierge- trocknetes Fleisch	4,31	90,06	-	-	-	-	Martem yanova (1958)

zu Preßwasser kann die Zusammensetzung erheb-
lich schwanken.

Tab. A 4: Zusammensetzung von Kabeljau-Fischmehlen

Aus Kabeljau	Wasser %	RP %	Fett %	Asche %	Ca mg/ 100g	P mg/ 100g	Literaturangabe
Fischmehl (Japan)	7,1	66,5	4,7	16,9	5280	3560	Higashi (1962)
Fischmehl (Island)	9,0	67,1	2,8	19,6	5970	3980	Murayama und Yanase (1962)
Fischmehl (Norwegen)	11,0	49,8	1,4	34,8	-	-	Breirem (1954)
Vollfischmehl (Norwegen)	9,2	73,8	4,1	13,5	-	-	Breirem (1954)
Fischmehl (Deutschland)	10,0	59,2	9,8	21,5	-	-	Nehring (1956)
Fischmehl (Deutschland)	12,0	63,9	2,4	21,5	8300	4000	DLG Nährwert-Ta- bellen (1965)

1.3.3. Der Gehalt an Aminosäuren im Fischfleisch und in Abfällen

Nach den Tabellen A 5 und A 6 schwanken die Literaturangaben über den Aminosäuregehalt im Fischfleisch bzw. in Abfällen des Kabeljaus nicht unerheblich. Diese Schwankungen können auf folgende Gegebenheiten zurückzuführen sein:

- a) Es fehlt an einheitlichen Bestimmungsmethoden für die einzelnen Aminosäuren. Im allgemeinen erfolgen die Bestimmungen auf mikrobiologischem, chromatographischem oder auf chemischem Weg. Die dabei erzielten Ergebnisse sind oft nicht miteinander zu vergleichen.
- b) Die Durchführung der Hydrolyse, als unentbehrliche Vorstufe der Aminosäurenbestimmung

wird z. T. sehr unterschiedlich gehandhabt, wie z. B. Temperatur und Dauer der Hydrolyse oder Durchführung als enzymatische, saure oder alkalische Hydrolyse etc.

- c) Häufig fehlen die Angaben über Art und Herkunft des Materials (mit oder ohne Preßwasser, Fanggebiet etc.), über seine Vorgeschichte oder über die Behandlung vor der Analyse etc.; d.h., daß zumeist eine vergleichbare Ausgangsbasis nicht gegeben ist.

1.3.3.1. Der Gehalt an "verfügbarem Lysin"

Nach C a r p e n t e r et al. (1957) beträgt der Gehalt an "verfügbarem Lysin" in vakuumgetrocknetem Filet 8,12 %, im Abfall 6,26 % (bezogen auf T.S.). O l l e y und W a t s o n (1961) gaben für einen niedrigen Gehalt an "verfügbarem Lysin" in Fischmehl die folgenden möglichen Ursachen an:

- a) Das Fischmehl ist unsachgemäß getrocknet,
- b) Das Fischmehl ist sachgemäß getrocknet, aber das Ausgangsmaterial enthält viele geringwertige Fischteile (Filetabfälle, Köpfe, Häute etc.);
- c) Das Ausgangsmaterial ist vor der Herstellung unsachgemäß behandelt und gelagert worden, d. h. bereits durch fortgeschrittenen Verderb abgebaut.

1.3.3.2. Der Gehalt an Tryptophan

Aus den Tabellen A 5 und A 6 ist ersichtlich, daß die Angaben über den Gehalt an Tryptophan im Filet des Kabeljaus zwischen 0,79 % und 1,32 %, und im Abfall zwischen 0,6 % und 1,0 % schwanken. Diese Differenzen

stellen ein typisches Beispiel der unter 1.3.3. angegebenen Gründe für die unterschiedlichen Aminosäure-Werte in der Literatur dar.

1.3.3.3. Der Gehalt an Glycin und Hydroxyprolin

Bei der Analyse von Fischen und Fischmehlen im Rahmen der Qualitätsbeurteilung wurde bisher dem Glycin wenig Bedeutung beigemessen, noch weniger dem Hydroxyprolin, über das sich in der Literatur keine Angaben finden.

Aus den Tabellen A 5 und A 6 geht lediglich hervor, daß der Gehalt an Glycin im Filet 5,08 % beträgt, chromatographisch bestimmt nach der Methode von M o o r e , S p e c k m a n n und S t e i n (1958) [s. C o n e l l and H o w g a t e (1959)]. Über den Gehalt an Glycin im Fischabfall waren keine Daten zu finden.

2. Experimenteller Teil

2.1. Vorbereitung des Rohmaterials

Die für die folgenden Untersuchungen verwendeten Fische, Kabeljau aus der Nordsee (März/April 1963), wurden auf der Fischauktion in Bremerhaven bezogen und zwar A-Ware (gute Qualität). Die Fische waren wie üblich ausgeweidet (ohne Eingeweide) in Kisten mit Eis gelagert. Insgesamt wurden 40 kg Kabeljau verarbeitet.

Die Fische wurden in drei Gruppen aufgeteilt:

Gruppe A: Verarbeitung von filetierten Fischen zu "Filetmehl".

Gruppe B: Verarbeitung von ganzen Fischen zu "Ganzfischmehl".

Gruppe C: Verarbeitung der beim Filetieren anfallenden Abfälle (Gräten, Köpfe, Häute, z. T. mit noch anhaftenden Fleischresten) zu "Abfallmehl".

2.1.1. Das Filetieren:

Beim Filetieren werden die Fleischpartien der vorher gewogenen Fische am Rücken und den Seiten des Fisches möglichst ohne Gräten vom Skelett, der Hauptgräte und den Bauchgräten abgetrennt. Dabei ergeben sich pro Fisch etwa zwei gleichlange Streifen nahezu grätenlosen Fleisches. Die Filets wurden ebenfalls gewogen und die Ausbeute des Filetierens berechnet. Für die weitere Verarbeitung wurden die Filets aller Fische gemeinsam in einem Mixer homogenisiert.

2.1.2. Das Zerkleinern der Abfälle:

Die Abfälle wurden zuerst in einer Zerkleinerungsmaschine (Cutter) weitgehend grob zerkleinert. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß eine Erwärmung des Materials möglichst vermieden wird. Dieses wurde durch mehrmaliges Bearbeiten erreicht. Um ein weitgehend homogenes Material zu erzielen, wurden die Abfälle anschließend in einem kleineren Fleischwolf mehrmals durchgedreht.

2.1.3. Das Zerkleinern der ganzen Fische:

Die ganzen Fische (je 3 - 4 Stück) wurden zuerst mit dem Schlachtmesser in Stücke geschnitten und, wie bei den Abfällen beschrieben, weiterverarbeitet.

Von dem homogenisierten Material der drei Gruppen wurde jeweils eine Durchschnittsprobe für die allgemeine chemisch-analytische Grundanalyse (Rohprotein, Rohfett, Rohasche etc.) entnommen.

2.2. Verarbeitung (Trocknung) des Untersuchungsmaterials

Das homogenisierte Material der drei Zubereitungsformen wurde folgenden 4 Trocknungsarten unterworfen:

2.2.1. Gefriertrocknung:

Etwa 200 - 300 g homogenes Material wurden gleichmäßig in dem unteren Teil des Gefriertrocknungsapparates (Abb. A 0) verteilt. Teller A wurde an den oberen Teil des Apparates fest angeschraubt, der Trichter B mit Trockeneis und etwa 40 ml Aceton - um das Schmelzen des Trockeneises zu verlangsamen - gefüllt;

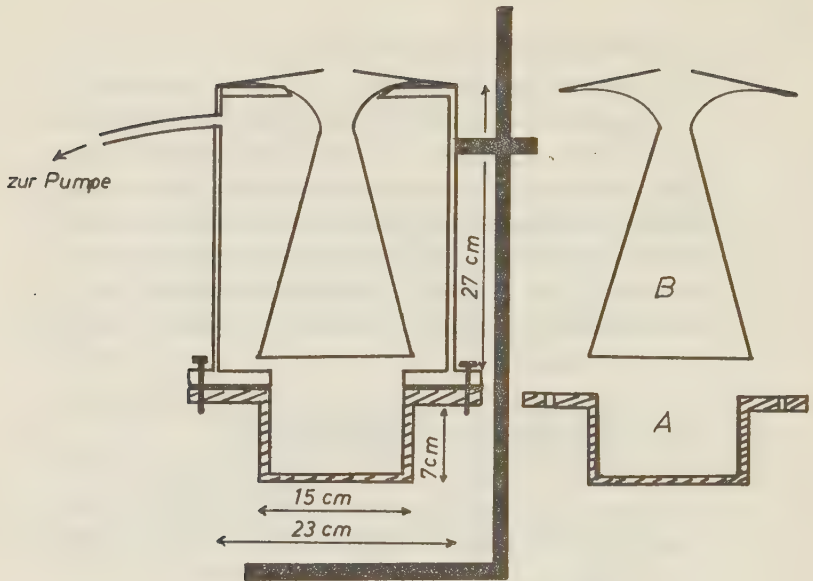


Abb. A-0 Der Gefriertrocknungsapparat „LEYBOLD“

dann wurde die Saugpumpe angeschaltet. Das Vakuum ist am Anfang der Trocknung niedrig und steigt gegen Ende der Trocknung bis zu etwa $0,75 \cdot 10^{-3}$ Torr an. Der Trichter muß während der Trocknung ständig mit Trockeneis gefüllt sein, damit der entstehende Wasserdampf (durch Sublimation) an der stark unterkühlten Außenwandung unmittelbar kondensiert und so ein hohes Vakuum erhalten bleibt.

2.2.2. Trocknung bei 40° C (Vakuumtrockenschrank):

Das Trocknen bei dieser niedrigen Temperatur muß im Vakuum vorgenommen werden, da die Herabsetzung des Siedepunktes eine verhältnismäßig rasche Trocknung unter Schonung des Materials ermöglicht H e i s s (1950). Das homogene Material wurde gleichmäßig in Porzellanschalen verteilt und in einem Vakuumtrockenschrank bei 40° C getrocknet. Das Vakuum betrug im Durchschnitt 10 - 15 Torr.

2.2.3. Trocknung bei 70° C (Trockenschrank):

Das homogene Material wurde in Porzellanschalen gleichmäßig verteilt. Die Trocknung erfolgte im Trockenschrank.

2.2.4. Trocknung bei 100° C (Trockenschrank):

Siehe unter 2.2.3.

2.3. Die Ausbeute beim Verarbeiten der Fische

2.3.1. Die Ausbeute an Filets:

Wie aus Tabelle A 7 zu ersehen ist, beträgt der nach dem Filetieren anfallende Filetanteil etwa 42 Hundertteile, das entspricht einem Abfall-

anteil von etwa 58 Hundertteilen.

Tab. A 7: Die Ausbeute beim Filetieren

Fisch- Einwaage kg	Filet- Auswaage kg	% Ausbeute
11,490	4,840	42,2
11,470	4,570	39,9
11,450	5,050	44,1
Durchschnitt der Ausbeute		42,06

2.3.2. Die Ausbeute an Trockengut nach der Trocknung:

In den Tabellen A 8 bis 12 ist die jeweilige Ausbeute an Trockengut wiedergegeben, und zwar sowohl getrennt nach Ausgangsmaterial, wie Filets, Ganzfisch und Abfälle, als auch getrennt für die verschiedenen Trocknungsverfahren.

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß die Filetproben wegen ihres geringen Aschegehaltes bzw. höheren Wassergehaltes die geringste Ausbeute ergeben, während die Abfallproben wegen ihres hohen Aschegehaltes bzw. niedrigen Wassergehaltes die größte Trockenausbeute aufweisen. Die Proben aus ganzen Fischen liegen erwartungsgemäß dazwischen.

Tab. A 8: Gefriertrocknung (Gt) von Filet, ganzen Fischen
und Abfall

Probe	Rohware Einwaage g	Mehl Einwaage g	Ausbeute %	Wasser- gehalt %	Zeit in St.
Filet	223	50	22,4		
"	222	40	18,0		
"	209	41	19,6	6,2	21
"	256	56	21,8		
Mittlere Ausbeute der Gt:			20,9 % Filetmehl		
Ganzer Fisch	223	55	24,6		
"	225	53	23,6		
"	222	56	25,2	6,8	26
	220	43	20,0		
Mittlere Ausbeute der Gt:			23,3 % Ganzfischmehl		
Abfall	228	70	24,2		
"	366	88	24,0	6,5	22
"	350	86	24,6		
Mittlere Ausbeute der Gt:			24,2 % Abfallmehl		

Tab. A 9: Vakuumtrocknung von Filet, ganzen Fischen und
Abfall bei 40° C

Probe	Rohware Einwaage g	Mehl Einwaage g	Ausbeute %	Wasser- gehalt %	Zeit in St.
Filet	221	44	19,8		
"	160	33	20,6	6,4	19
"	199	42	21,1		
"	162	34	20,9		
Mittlere Ausbeute bei 40° C:			20,8 % Filetmehl		
Ganzer Fisch	133	30	22,5		
"	208	46	22,1	6,0	22 1/2
"	218	48	22,0		
"	265	60	22,6		
Mittlere Ausbeute bei 40° C:			22,3 % Ganzfischmehl		
Abfall	284	63	22,1		
"	164	39	23,7	6,6	22
"	214	48	22,4		
"	149	37	24,8		
Mittlere Ausbeute bei 40° C:			23,5 % Abfallmehl		

Tab. A 10: Trocknung von Filet, ganzen Fischen und Abfall
bei 70° C (Trockenschrank)

Probe	Rohware Einwaage g	Mehl Einwaage g	Ausbeute %	Wasser- gehalt %	Zeit in St.
Filet	131	30	23,0		
"	122	27	23,0	6,8	18
"	103	22	21,4		
"	100	21	21,0		
Mittlere Ausbeute bei 70° C:			22,1 % Filetmehl		
Ganzer Fisch	193	44	22,8		
"	186	44	23,6	6,6	22
"	171	40	23,3		
"	180	41	22,8		
Mittlere Ausbeute bei 70° C:			23,4 % Ganzfischmehl		
Abfall	137	33	24,0		
"	131	32	24,4	6,2	20
"	186	46	24,8		
"	214	50	23,3		
Mittlere Ausbeute bei 70° C:			24,4 % Abfallmehl		

Tab. A 11: Trocknung von Filet, ganzen Fischen und Abfall
bei 100° C (Trockenschrank)

Probe	Rohware Einwaage g	Mehl Einwaage g	Ausbeute %	Wasser- gehalt %	Zeit in St.
Filet	101	17	17,0		
"	96	16	16,7	3,3	16
"	109	21	19,3		
"	96	17	17,7		
Mittlere Ausbeute bei 100° C:			17,7 % Filetmehl		
Ganzer Fisch	76	16	21,0		
"	138	28	20,1	3,3	18
"	129	27	20,9		
"	133	28	21,9		
Mittlere Ausbeute bei 100° C:			20,7 % Ganzfischmehl		
Abfall	181	43	23,7		
"	264	58	22,0	3,3	18
"	239	55	23,0		
"	230	50	21,7		
Mittlere Ausbeute bei 100° C:			22,7 % Abfallmehl		

Tab. A 12: Mittlere Ausbeuten bei den 4 Trocknungstempera-
turen (%)

Rohware	Gt	40° C	70° C	100° C
Filet	20,9	20,8	22,1	17,7
Ganzfisch	23,3	22,3	23,4	20,7
Abfall	24,2	23,5	24,4	22,7

2.3.2.1. Abhängigkeit der Ausbeute vom Wassergehalt des Endproduktes:

Es ist festzustellen, daß die Trockenausbeute bei den verschiedenen Trocknungsverfahren innerhalb einer Mehllart nicht konstant ist. Sie hängt vielmehr vom Wassergehalt des Endproduktes ab. In Abbildung A 1 ist die Ausbeute gegen den Wassergehalt aufgetragen, jeder Punkt stellt den Durchschnitt von 4 Bestimmungen dar. Diese Abbildung zeigt, daß bei den Filetproben die Werte stärker variieren als bei den Proben aus ganzen Fischen bzw. aus Abfällen.

Aus Abbildung A 1 kann für jedes Material die zu einem bestimmten Wassergehalt zugehörige Ausbeute abgelesen werden. Sie kann z. B. auch dafür benutzt werden, die Menge des Ausgangsmaterials aus dem Wassergehalt des Endproduktes annähernd zu berechnen.

Die aus Abbildung A 1 errechnete Menge Rohmaterial, die zur Herstellung von 1 kg Mehl benötigt wird, geht in etwa aus folgender Aufstellung hervor:

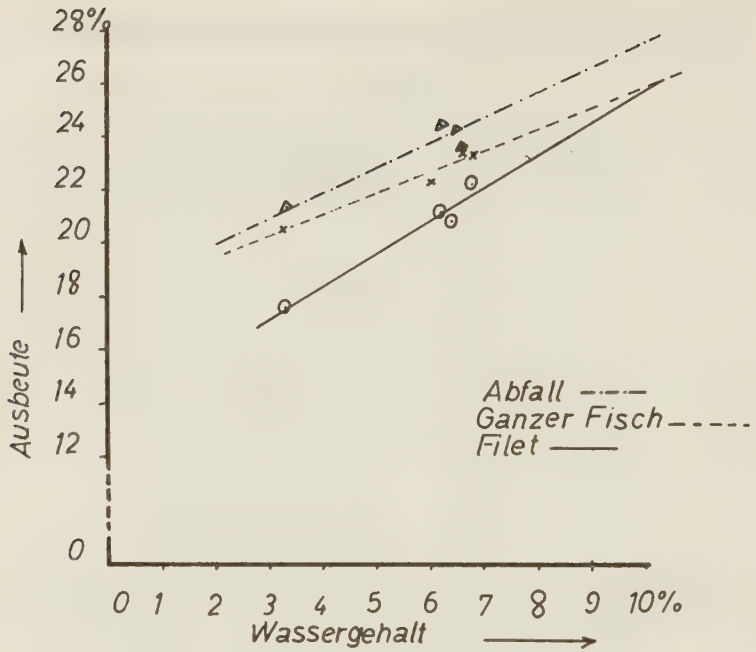


Abb. A1 Abhängigkeit der Trocknungsausbeute
vom Wassergehalt des Endproduktes

Tab. A 13: Berechnung der erforderlichen Rohstoff-
menge zur Herstellung von 1 kg Fischmehl

Rohware	Wassergehalt des Endproduktes	Erforderliche Rohwarenmenge
Filets	5 %	$\frac{100}{19,6} = 5,10 \text{ kg}$
	10 %	$\frac{100}{26} = 3,85 \text{ kg}$
Ganze Fische	5 %	$\frac{100}{22} = 4,55 \text{ kg}$
	10 %	$\frac{100}{25,6} = 3,90 \text{ kg}$
Abfall	5 %	$\frac{100}{23} = 4,35 \text{ kg}$
	10 %	$\frac{100}{27,4} = 3,65 \text{ kg}$

2.4. Die chemische Zusammensetzung des Rohmaterials und der Endprodukte

Tab. A 14: Chemische Zusammensetzung des Rohmaterials
bezogen auf T. S.

	Filet	Ganzer Fisch	Abfall
Rohfett (gesamt)	3,14	3,70	3,87
Rohfett (Ätherextr.)	1,27	1,45	1,65
Rohprotein	90,28	79,74	74,71
Rohasche	5,40	16,09	21,14
100 %	98,82	99,53	99,72

In der Tabelle A 14 ist die Zusammensetzung des Rohmaterials, von dem die verschiedenen Proben für die Herstellung der Fischmehle entnommen wur-

den, angegeben. Diese Zahlen sind Durchschnittswerte. Alle drei Mehlsorten (Filet, Ganzfisch und Abfall) sind durch einen hohen Rohproteingehalt ausgezeichnet (selbst beim Abfall mindestens 74 % Rohprotein in der T. S.).

Der Rohfettgehalt (Ätherextrakt nach Soxhlet) ist in den drei Sorten unterschiedlich, am höchsten beim Abfall. Obwohl der nach vorangegangenen Säureaufschluß (Weilbull - Stoldt) bestimmte Gesamtfettgehalt etwa 2,5 mal so hoch liegt wie der ohne Aufschluß extrahierte Fettanteil (Soxhlet), wird ein Fettgehalt von 5 % in keinem Fall überschritten. Die erhaltenen Endprodukte (Tabelle A 15) zählen nach S t a n s b y (1961) noch zu den fettarmen Fischmehlen.

Die Herstellung möglichst fettarmer Fischmehle ist, wegen der geringeren Gefahr geschmacklich ungünstiger Veränderungen der Mehle, erwünscht. Bereits Allardyce et al. (1933) stellten fest, daß höhere Fettgehalte in Fischmehlen für Fütterungsversuche wegen der Oxydationsfähigkeit (Vertranung) der Fischöle nicht vorteilhaft sind.

Der Rohprotein- und der Rohaschegehalt werden, wie aus Tab. A 15 und der Abb. A2 hervorgeht, durch die Trocknungstemperatur praktisch nicht beeinflusst, wohl aber der Gehalt an direkt extrahierbarem Fett (Soxhlet).

Zum Gehalt an Kalzium (Ca) und Phosphor (P), bzw. über ihr Verhältnis zueinander (Ca : P), ist folgendes festzustellen:

- a) Die Filetmehle zeichnen sich durch einen sehr niedrigen Ca-Gehalt und einen relativ hohen P-Gehalt aus. Das Ca : P-Verhältnis von 0,24 : 1 ist für Fütterungszwecke als kaum geeignet zu

Tab. A 15: Die Zusammensetzung der Fischmehlsorten nach der Trocknung

	Trocknungstemperatur:	Gt	40° C	70° C	100° C
Filet	Rohfett (gesamt)	-	-	-	3,09
	Rohfett (Ätherextr.)	1,24	1,09	0,85	0,84
	Rohprotein	90,36	89,45	89,30	89,40
	Rohasche	5,98	5,90	5,90	5,91
	Ca	0,27	0,25	0,25	0,25
	P	1,03	1,15	1,09	1,15
	100 %	97,58	96,44	96,05	96,15
Ganzer Fisch	Rohfett (gesamt)	-	-	-	3,80
	Rohfett (Ätherextr.)	1,52	1,39	1,25	1,22
	Rohprotein	81,71	80,47	80,04	80,03
	Rohasche	14,42	14,10	13,82	13,70
	Ca	3,30	3,60	3,50	3,30
	P	3,00	3,00	3,00	2,90
	100 %	97,34	95,96	95,11	94,95
Abfall	Rohfett (gesamt)	-	-	-	3,81
	Rohfett (Ätherextr.)	1,71	1,23	0,78	0,61
	Rohprotein	74,70	74,14	74,20	74,27
	Rohasche	20,68	20,62	20,61	20,40
	Ca	6,40	6,40	6,00	5,90
	P	4,50	4,20	4,10	4,10
	100 %	97,09	96,99	95,59	95,28

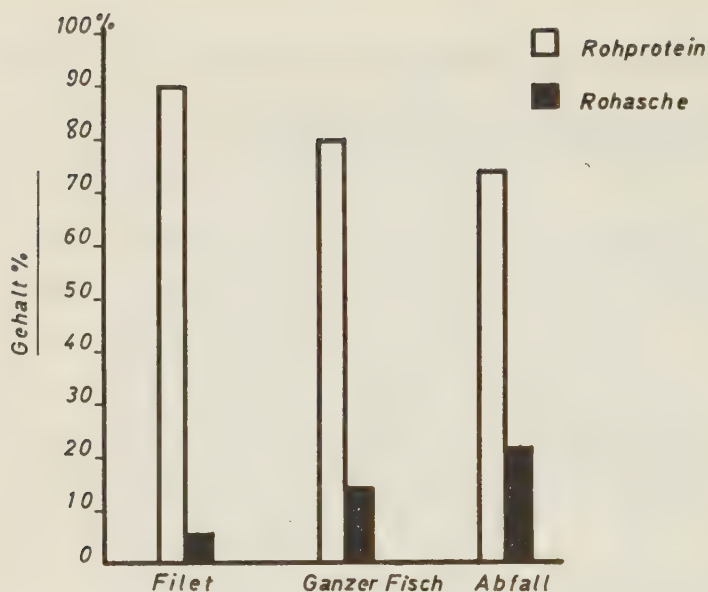


Abb. A2 Gehalt an Rohprotein und Rohasche in den verschiedenen Fischmehlorten

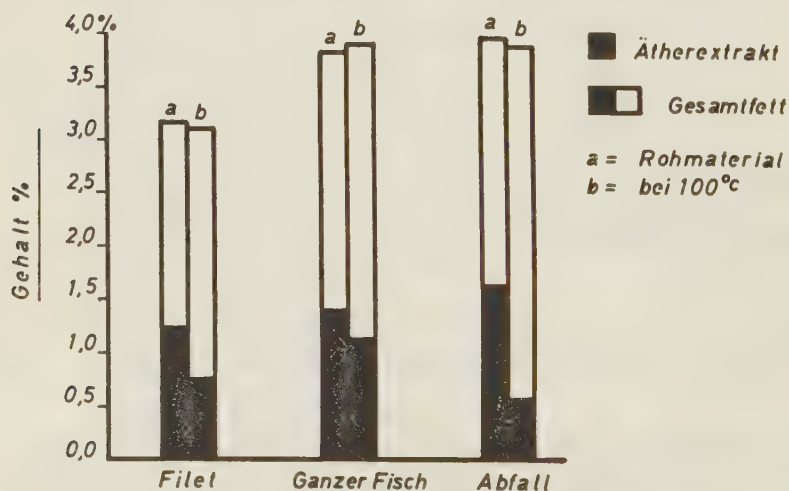


Abb. A3 Gehalt an Ätherextrakt und Gesamtfett in den verschiedenen Fischmehlorten



Abb. A4 Ca- und P-Gehalt der Filet-Proben

■ Ca □ P

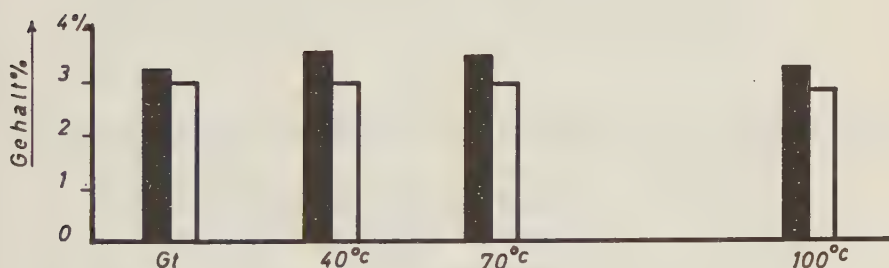


Abb. A5 Ca- und P-Gehalt der Ganzfisch-Proben

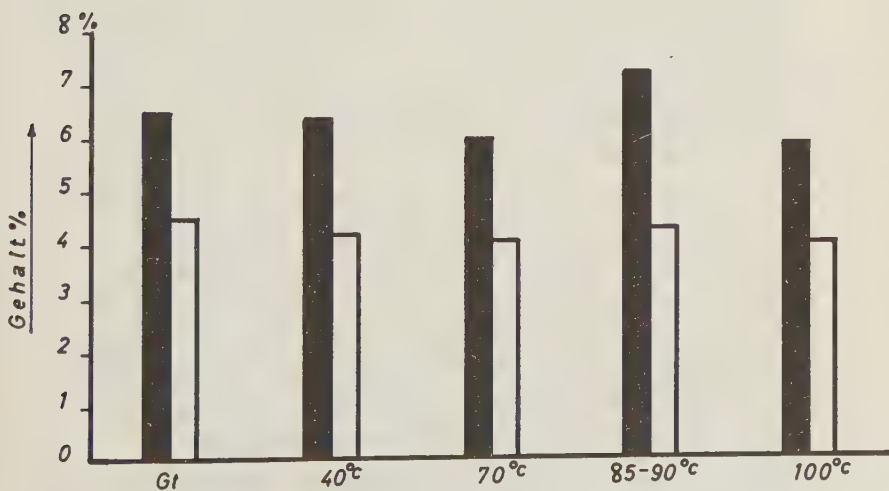


Abb. A6 Ca- und P-Gehalt der Abfall-Proben

- bezeichnen, dieses soll in ernährungsphysiologischer Sicht möglichst bei etwa 2 : 1 liegen.
- b) Die Ganzfischmehle haben einen höheren Gehalt an Ca und P. Das Ca : P-Verhältnis von 1,1 : 1 ist jedoch nicht befriedigend.
- c) Die Abfallmehle zeichnen sich dagegen durch einen hohen Ca- und P-Gehalt aus, ihr Ca : P-Verhältnis von 1,4 : 1 kann bei ausreichendem Angebot beider Mineralstoffe als verhältnismäßig gut angesehen werden B r u n e und
G ü n t h e r (1961) .

2.5. Einfluß der Trocknungstemperatur auf den Fettgehalt

Aus Tab. A 15 und Abb. A 7 ist ersichtlich, daß der Gehalt an direkt extrahierbarem Rohfett (nach Soxhlet) mit steigender Trocknungstemperatur abnimmt. In den Filetproben bleiben bei 100° C Trocknungstemperatur 67 v. H., bei den Ganzfischproben 80 v. H. und bei den Abfallproben 41 v. H. des ursprünglichen Ätherextraktes erhalten. Den größten Verlust weisen demnach die Abfallmehle auf. Das kann auf einem unterschiedlichen Einfluß der Trocknungstemperatur auf die direkt extrahierbaren Lipide hindeuten, bzw. auf die unterschiedliche Zusammensetzung des Fettes im Filet, im ganzen Fisch und in den Abfällen.

Dabei ist bemerkenswert, daß nur der direkt extrahierbare Fettanteil (nach Soxhlet) durch die Trocknungstemperatur beeinflusst wird, während der nach Säureaufschluß extrahierbare Gesamt-Fettgehalt (nach Weilbull-Stoldt) erhalten bleibt. Durch die Hitzebehandlung wird ein Teil des Fettes wahrscheinlich durch denaturiertes Protein eingeschlossen bzw. auch unter Bildung hochmolekularer in Äther wenig löslicher Verbindungen, die die Fett-

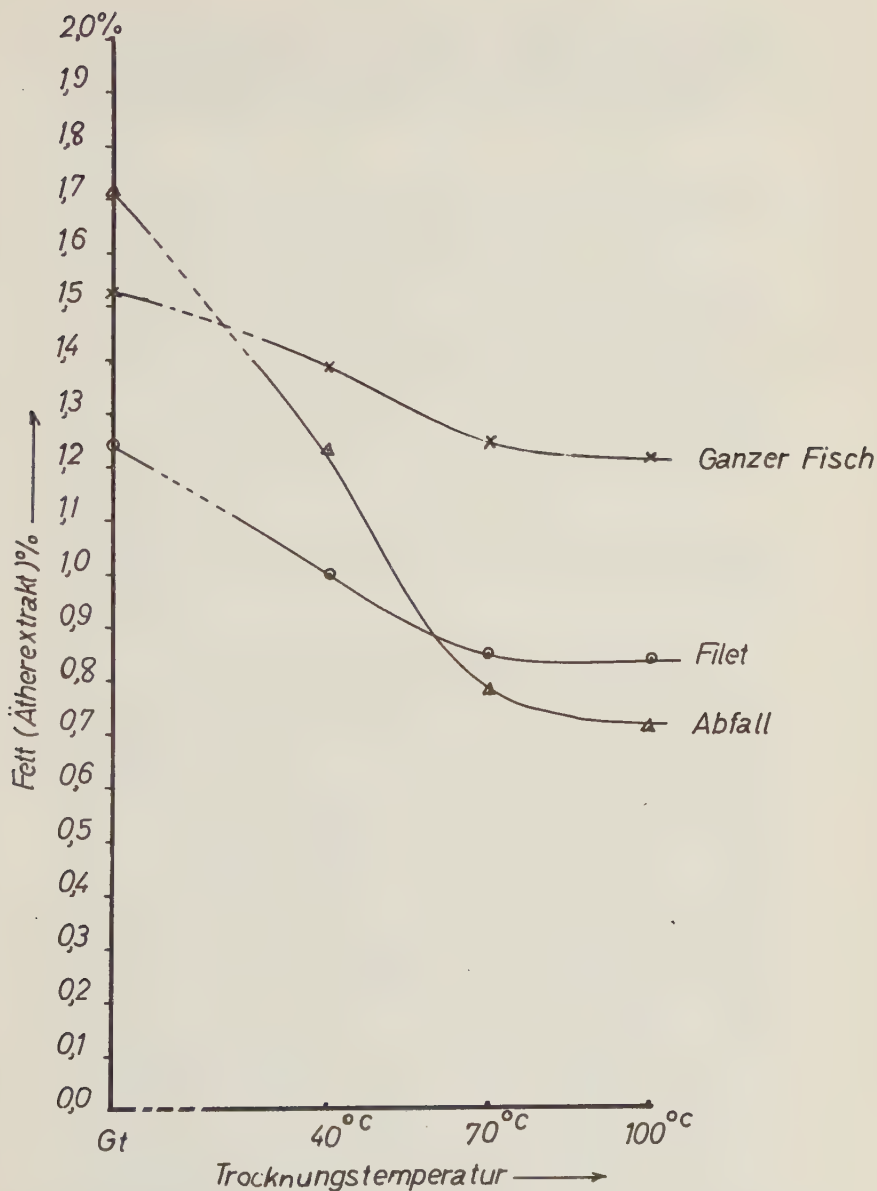


Abb. A 7 Einfluß der Trocknungstemperatur auf den Gehalt an Fett (Ätherextrakt) in den verschiedenen Fischmehlsorten

ausbeute in direktem Ätherextrakt herabsetzen können, polymerisiert. In Abb. 7 ist der Einfluß der Trocknungstemperatur graphisch dargestellt.

B Die biologische Bewertung =====

des Proteins =====

1. Theoretischer Teil

Die biologische Bewertung eines Proteins kann auf vier verschiedenen Wegen erfolgen:

- a) Durch die Feststellung der Gewichtszunahme von Versuchstieren, wie die "protein efficiency ratio" (PER) und die tägliche Zunahme an Gewicht (ΔG).
- b) durch die Aufstellung einer Stickstoff (N)-Bilanz.
- c) Durch die Bestimmung des Verdaulichkeitskoeffizienten.
- d) Durch kombinierte Methoden, wie die biologische Wertigkeit (BW) und die "net protein utilization" (NPU).

1.1. Feststellung der Gewichtszunahme (PER und ΔG)

Mit diesen Bewertungsmaßstäben PER und ΔG lassen sich die Auswirkungen eines geprüften Proteins auf das Wachstum bzw. die Gewichtszunahme ermitteln.

$$\text{PER} = \frac{\text{Gewichtszunahme in g}}{\text{g Protein-Zufuhr}} \quad \Delta G = \frac{\text{Gewichtszunahme in g}}{\text{Versuchsdauer in Tagen}}$$

Sie geben allerdings keine Auskunft über die Menge des jeweiligen Proteins, die erforderlich ist, um den Erhaltungsbedarf des Tieres zu decken, haben jedoch den Vorteil, daß sie die Untersuchungen ohne besonderen Laboratoriumsaufwand ermöglichen. Voraussetzung für eine zuverlässige Durchführung ist allerdings, daß die Tiere von etwa gleichem Gewicht sein müssen, und die durchschnittliche Fut-
teraufnahme der einzelnen Tiere möglichst konstant ist.

1.2. Die Stickstoff (N)-Bilanz

Die N-Bilanz ist der "älteste" biologische Bewertungsmaßstab für die Qualitätsbeurteilung von Proteinen.

N-Bilanz = N-Einnahme abzüglich N-Ausscheidung
in Kot und Harn.

$$\text{N-Bilanz \%} = \frac{\text{N-Bilanz}}{\text{N-Einnahme}} \cdot 100$$

Es wird dabei von der Voraussetzung ausgegangen, daß der einzige Weg für die N-Ausscheidung des Körpers über den Kot und Harn erfolgt. Die N-Bilanz kann dabei positiv oder negativ sein. Die positive N-Bilanz stellt die N-Menge dar, die für den Fleischansatz bzw. die Gewichtszunahme bei einem wachsenden Tier zur Verfügung steht. Es ist zu erwarten, daß die N-Bilanz um so günstiger ausfällt, je höher die Qualität des geprüften Proteins ist. Über die Eignung der N-Bilanz-Methode als alleiniger Maßstab für die Qualitätsbeurteilung von Proteinen herrscht in der Literatur keine Übereinstimmung. Einige Autoren, die sich für das Körperanalyse-Verfahren aussprechen, geben dem N-Bilanz-Verfahren den Vorzug, andere hingegen (u.a.

M i t c h e l l , N e h r i n g) kritisieren dieses Verfahren, da die N-Bilanz keine Auskunft über den Erhaltungsbedarf des Tieres geben kann. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht aufzuzeigen, inwieweit die N-Bilanz-Werte mit den anderen biologischen und chemischen Bewertungsmaßstäben übereinstimmen.

1.3. Die Verdaulichkeitskoeffizienten

Die scheinbare Verdaulichkeit gibt an, wieviele Teile eines geprüften Proteins (N-Einnahme) für das Tier als verdauliches Protein anzusehen sind,

unter Abzug der N-Menge, die im Kot zur Ausscheidung gelangt.

Für die Berechnung der wahren Verdaulichkeit hingegen wird außerdem die N-Menge berücksichtigt, die als Darmverlust-Nitrogen (DVN) bezeichnet wird, d. h. als körpereigener-N nicht aus der N-Einnahme stammt. (Die Menge des DVN wird in einem N-freien Parallelversuch ermittelt). Folglich ist die wahre Verdaulichkeit immer höher als die scheinbare Verdaulichkeit.

Scheinbare Verdaulichkeit = $\frac{\text{N-Einnahme} - \text{N-Ausscheidung im Kot}}{\text{N-Einnahme}}$

Wahre Verdaulichkeit = $\frac{(\text{N-Einnahme} - \text{N-Ausscheidung im Kot}) + \text{DVN}}{\text{N-Einnahme}}$

Es erscheint darüber hinaus erforderlich, etwas über den verdaulichen Anteil des geprüften Proteins aussagen zu können, zumal der nicht aufgespaltene unverdaute Proteinanteil nicht zur Resorption gelangt. Die Bedeutung der wahren Verdaulichkeit liegt darin, daß sie ein Maßstab für die "in vivo" verdaute Proteinmenge ist. Mit ihrer Hilfe ist die Berechnung der NPU (net protein utilization) möglich, was im folgenden noch näher erläutert wird.

1.4. Die biologische Wertigkeit (BW)

Der Begriff "biologische Wertigkeit" als ein Bewertungsmaßstab für Proteine stammt von Thomas (1909): "Die biologische Wertigkeit gibt mir an, wie viele Teile Körperstickstoff durch 100 Teile Nahrungsstickstoff vertreten werden können Berechne ich den Stickstoffumsatz als Urinstickstoff, vermehrt um 1 g aus Verdauungsekreten stammend, so mache ich dabei eine Voraussetzung, die vielleicht nicht für alle Fälle zu -

trifft, ich bin mir des Fehlers, diese Größe als Stickstoffumsatz anzusehen, wohl bewußt." Er gab für die Berechnung der biologischen Wertigkeit 3 Schemata an, eines davon ist folgendes:

$$BW = 100 \cdot \frac{\text{Urin-N bei N-freier Kost} + \text{N-Bilanz} + 1}{\text{N-Einnahme} - \text{Kot-N} + 1}$$

Die BW, wie sie von T h o m a s definiert worden ist, gilt für den Erhaltungsbedarf. Er experimentierte mit sich selbst; der Schwerpunkt seiner Versuche war der erwachsenen Mensch. M i t c h e l l (1923) war jedoch der erste, der die BW an wachsenden Ratten bestimmt hat. Das hat den Vorteil, daß mittels wachsender Tiere die BW sowohl für die Erhaltung, als auch für das Wachstum erfaßt werden kann: "Die Methode beruht auf der Bestimmung der N-Bilanz unter streng konstanten Versuchsbedingungen. Sie erfordert nach M i t c h e l l eine direkte Bestimmung des N-Gehaltes sowohl im Harn als auch im Kot; sowie indirekte Bestimmung des aus dem Futter stammenden N-Anteils im Harn und im Kot." Er definierte die BW als den prozentualen Anteil des retinierten N zum absorbierten N:

$$BW = 100 \cdot \frac{Ne - [(Kot\ N - DVN) + Harn\ N - EHN]}{Ne - (Kot\ N - DVN)}$$

Ne = N-Einnahme

DVN = Darmverlustnitrogen

EHN = Endogenes Harnnitrogen

Der Schwerpunkt der Thomas - Mitchell - Methode liegt darin, daß sie den von F o l i n (1905) stammenden Begriff "endogener N und exogener N" akzeptiert. Aus Versuchen, die mit markiertem N durchgeführt wurden Schönheimer (1939), Schönheimer et al. (1941), geht hervor, daß die N-haltige Körpersubstanz sich in einem "dynamischen

Gleichgewicht" befindet. Der lebhafteste Abbau, Aufbau und Austausch der Aminosäuren hat zu dem Begriff "metabolischer Pool" geführt. Aus dem Aminosäurengemisch des Pools werden die einzelnen Aminosäuren zum Aufbau der Körperproteine je nach dem Körperbedarf herangezogen, der Rest wird ausgeschieden. Dieser Theorie widerspricht die Annahme von der Existenz eines unter allen Bedingungen konstanten endogenen Stickstoff- bzw. Eiweißminimums. Dieser Einwand ist nicht ganz unberechtigt, da es kein unter allen Bedingungen absolutes "Eiweißminimum" gibt. Bereits R u b n e r (1897) stellt fest: "Das Suchen nach einem Eiweißminimum wird überhaupt nie von einem Erfolg begleitet sein, weil es eben nicht e i n sondern v i e l e Eiweißminima, mit welchen die Ernährungslehre rechnen muß, gibt. Ein Eiweißminimum läßt sich nur feststellen, wenn man ganz genau bestimmt, mit welchem Nahrungsmittel es erreicht werden soll."

M i t c h e l l (1955) bewies experimentell, unter der Voraussetzung einiger konstanter Versuchsbedingungen wie Futteraufnahme, Gewicht der Tiere usw., nicht nur die Existenz von sogenanntem endogenem N, er zeigte auch, daß damit manches zur Aufklärung von Problemen im Proteinstoffwechsel ausgesagt werden kann. Das wurde von vielen Autoren nicht ohne weiteres akzeptiert, aus diesem Grund wurde die Thomas-Mitchell-Methode immer wieder aufs neue angegriffen. M ü l l e r und H ö t z e l (1957) und H ö t z e l (1958) z. B. begnügen sich bei der Bestimmung der Proteinqualität mit der Ermittlung des "produktiven Protein Wertes" (PPW), ohne die endogene N-Ausscheidung zu berücksichtigen. Die PPW läßt allerdings keine Aussage über die Proteinqualität

für die erwachsenen Versuchstiere zu, außerdem entfällt auch die Möglichkeit, die "wahre Verdau-lichkeit" des betreffenden Proteins zu ermitteln. A l l i s o n et al. (1949) haben zwar den EHN als einen konstanten Wert nicht angegriffen, sie schlugen jedoch an Stelle der Bestimmung der BW die Berechnung des "nitrogen balance index" vor. Mit einer Änderung des Namens allein ist das Problem noch nicht gelöst [Zimmermann (1952)].

Neben der Kritik bzw. Ablehnung der Thomas-Mitchell-Methode durch manche Autoren wird sie von anderen bei der Ermittlung der Proteinwertigkeit - entweder auf biologischem oder auf chemischem Weg - bevorzugt; z. B. von C o l u m b u s (1954, 1954, 1959); N j a a (1959, 1961, 1963) für die biologische Bewertung und von K ü h n a u (1949), K o f r a n y í (1956), für die chemische Bewertung.

Die Thomas-Mitchell-Methode wurde von C o l u m b u s (1954) modifiziert. Columbus hat bewiesen, daß das Körpergewicht die naheliegende Bezugsgröße zur endogenen N-Bestimmung ist. Ihm erschien es zweckmäßig, in einem N-freien Versuch die endogenen Daten zu ermitteln, diese Daten nach Gewichtsklassen festzulegen und die Durchschnittswerte zur BW-Berechnung heranzuziehen.

Nach C o l u m b u s (1954) wird die BW wie folgt berechnet:

$$BW = \frac{N\text{-Bilanz} + NEB}{Ne - (Kot-N - DVN)} \cdot 100$$

NEB = Nitrogen-Erhaltungs-Bedarf = EHN + DVN

$$NEB = 2,11154 \cdot G^{0,66996} \quad DVN = 0,7096 \cdot G^{0,7555}$$

= mg N/Tier und Tag

Der Vorteil dieser Berechnungsart soll darin liegen, daß auf die schwierige EHN-Bestimmung verzichtet werden kann. Dafür wird die gesamte endogene N-Ausscheidung (NEB) erfaßt. Die NEB-Bestimmung ist nach C o l u m b u s weniger empfindlich als die EHN-Bestimmung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Thomas-Mitchell-Methode in der Modifikation nach C o l u m b u s (1954) eingesetzt. Dabei wurde anfangs versucht, nach den o. a. Gleichungen nach C o l u m b u s den NEB und den DVN zu errechnen. Die dabei erhaltenen Daten scheinen allerdings reichlich hoch zu sein. Sie sind auch höher als die Durchschnittswerte, die von M i t c h e l l und C a r m a n (1926) auf N-freie oder N-arme Versuche bezogen sind. Die Werte von C o l u m b u s stimmen wiederum mit denen von B e h m (1955) und von N j a a (1961) gut überein. Diese Autoren haben allerdings ihre Versuche mit Ratten, deren Gewicht über 100 g lag, durchgeführt.

Nach B r u n e (1963) wird der N-Grundumsatz und die Proteinqualität am besten an wachsenden Ratten bestimmt, deren Einsatzgewicht 35 - 40 g beträgt. Damit soll erreicht werden, daß sich die Ratten während der Versuchsperiode in höchster Wachstumsintensität befinden.

Wegen dieser Widersprüche erschien es zweckmäßig, bei den eigenen Untersuchungen einen N-freien Versuch vorzusehen.

1.5. Die "net protein utilization" (NPU)

1.5.1. Die Berechnung der NPU nach B l o c k und M i t c h e l l

Der NPU kann nach B l o c k und M i t c h e l l (1946) errechnet werden, indem der BW-Wert mit dem "wahren Verdaulichkeitskoeffizienten" (wV) multipliziert, und das Ganze durch 100 dividiert wird.

$$NPU = \frac{BW \cdot wV}{100} = \frac{N\text{-Bilanz} + NEB}{N_e}$$

Für die wachsenden Tiere werden die so ermittelten NPU-Werte als Summe der NPU für Erhaltung (NPU_m), und NPU für Wachstum (NPU_g) bezeichnet.

$$NPU = NPU_m + NPU_g$$

$$NPU_m = \frac{NEB}{N_e} \cdot 100$$

$$NPU_g = 100 \cdot \frac{N\text{-Bilanz}}{N_e} = N\text{-Bilanz} \%$$

Die NPU_m für das wachsende Tier gibt uns in Prozenten an, wieviel das Tier von einem geprüften Protein benötigt, um seinen Erhaltungsbedarf zu decken. Für Tiere mit gleichem Gewicht ist anzunehmen, daß die NPU_m eine von der Proteinart unabhängige konstante Menge ist. Demzufolge ist die NPU_m um so kleiner, je höher die N_e ist, und umgekehrt. Die NPU enthält also eine Summe, die mit zunehmender Futteraufnahme kleiner wird, und die die NPU negativ beeinflusst; allerdings unter der Voraussetzung, daß alle anderen Faktoren (wie Gewicht der Tiere, N-Gehalt des Futters usw.) so konstant wie möglich bleiben (B a r e n e s et al. (1964)). Die NPU_g für das wachsende Tier gibt uns in Prozenten an, wieviel von dem aufgenommenen Protein

für das Tier nach der Deckung seines Erhaltungsbedarfs übrig bleibt. Die NPU_g ist also ein Maßstab für den potentiellen Stickstoff, der das Wachstum des Tieres bestimmen kann. So definiert ist die NPU_g mit der N-Bilanz % identisch [N j a a (1963)].

Als Maßstab für das Wachstum dienen PER oder ΔG . In ΔG ist jedoch die Menge des verzehrten Proteins nicht berücksichtigt worden. ΔG eignet sich daher weniger als die PER dazu, mit der N-Bilanz % bzw. NPU_g in Beziehung gesetzt zu werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beziehung zwischen der N-Bilanz % bzw. NPU_g mit der PER näher studiert.

1.5.2. Die Berechnung der NPU (Körperanalyseverfahren)

M i l l e r u n d B e n d e r (1955) haben außerdem folgende Berechnungsart eingeführt:

$NPU =$

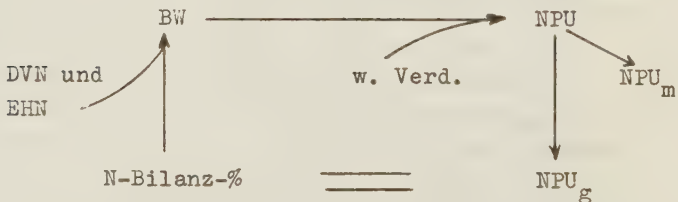
$$\frac{[\text{Körper-N-Zunahme}] + [\text{Körper-N-Verlust in N-fr. Versuch}]}{Ne}$$

Genau betrachtet weist allerdings diese Formel gegenüber der klassischen NPU-Formel (BW_{xwV}) keinen wesentlichen Vorteil auf. Die Körper-N-Zunahme wird durch Körperanalyse zu Anfang (an Vergleichstieren) und zu Ende der Versuchsperiode (an Versuchstieren) bestimmt. So berechnet, ist die Körper-N-Zunahme theoretisch mit der N-Bilanz, sowie der Körper-N-Verlust mit dem NEB identisch. Diese Berechnungsart ist also nur ein Umweg, der praktisch zu den gleichen Einzelaussagen (Komponenten) des klassischen Verfahrens führen müßte. Es kommt noch hinzu, daß die Körperanalyse nicht ohne Schwierigkei-

ten durchführbar ist. Im Vergleich mit der klassischen Methode besitzt sie einen größeren Variationskoeffizienten. (Vergl. hierzu auch Becker und Harnich: Gültigkeit und Exaktheit von Stoffwechselversuchen (1958), Rippón (1959): A comparison of several methods for estimating the nutritive value of proteins. Auch Tomarelley et al. (1959), Bunyan and Price (1960), Henry and Toothill (1962) haben keinen Vorteil der Körperanalyse-Methode gegenüber den klassischen Methoden feststellen können.

1.6. Über die biologischen Bewertungsmaßstäbe

Anfangs wurde versucht, die Proteine allein nach den N-Bilanz-Daten zu beurteilen. Später wurde jedoch erkannt, daß die N-Bilanz nur eine begrenzte Aussage zuläßt. So ist sie z. B. nicht in der Lage, etwas über den Erhaltungsbedarf des Tieres (von einem untersuchten Protein) auszusagen.



Durch die BW ist eine Methode entwickelt worden, die als ein Maßstab für Erhaltung und Wachstum zugleich angesehen werden kann. Die Bestimmung der "BW" basiert also als eine kombinierte Methode sowohl auf der Aufstellung der N-Bilanz als auch auf der Bestimmung der endogenen N-Ausscheidung beim sogen. Eiweißminimum (N-Zufuhr = 0). Sie vermag zwar keine direkte Aussage über die Verdaulichkeit

eines Proteins zu machen; mit Hilfe entsprechender Berechnungsformeln jedoch ist durch die BW die Bestimmung der "wahren Verdaulichkeit in vivo" möglich.

Bei der Ermittlung der NPU sind beide Bewertungsmaßstäbe (BW und "wahre Verdaulichkeit") berücksichtigt worden. Die "NPU" ist also ein kombinierter Maßstab, der auf der Bestimmung der N-Bilanz, der BW und der "wahren Verdaulichkeit" basiert. Er läßt sich weiter unterteilen in einen Maßstab für den Erhaltungsbedarf (NPU_m) und in einen Maßstab für das Wachstum (NPU_g). Theoretisch ist die N-Bilanz % mit der NPU_g identisch.

Da es tatsächlich möglich ist, mit Hilfe der BW über die NPU zum gleichen Ergebnis zu gelangen (d. h. $NPU_g = \text{N-Bilanz \%}$), ist damit die Eignung der "BW-Methode" für die Qualitätsbeurteilung von Proteinen bestätigt.

2. Experimenteller Teil

2.1. N-Bilanz- und Verdaulichkeits-Versuche

Für die Aufstellung der N-Bilanz und die Durchführung der Verdaulichkeitsversuche wurden für die Bewertung jedes einzelnen Futters zur Ermittlung der N-Bilanz jeweils eine Batterie von 10 Käfigen, sowie weitere 5 Käfige zur Ermittlung der Verdaulichkeit des untersuchten Proteins verwendet.

Die verwendete Ratten-Stoffwechsel-Batterie nach Brun e (1963) hat den Vorteil, daß sie das Verstreuen des Versuchsfutters nahezu vollkommen ausschließt, und gleichzeitig mit geringstem Zeitaufwand die Durchführung von exakten Verdaulichkeits- und Stoffwechselversuchen an zahlreichen Einzeltieren ermöglicht. Es kommt zwar gelegent-

lich vor, daß trotzdem in einer Batterie eine oder zwei Ratten das Futter verstreuen. Sollten in der Vorperiode solche Tiere beobachtet werden, wird auf diese Tiere verzichtet, es bleibt dann immer noch eine ausreichende Anzahl von Tieren für eine statistische Auswertung der Ergebnisse.

N-Bilanz-Versuch
10 Ratten

Verdaulichkeits-Versuch
5 Ratten

$$N\text{-Bilanz} = N_e - (Kot\text{-}N + Harn\text{-}N)$$

$$Kot\text{-}N = \frac{100 - sV}{100} \cdot N_e$$

$$sV = \frac{N_e - Kot\text{-}N}{N_e} \cdot 100$$

$$sV = \text{scheinbare Verdaulichkeit}$$

2.1.1. Versuchsdauer:

Das Sammeln von Kot bzw. von Kot und Harn-Gemisch beginnt erst nach einer Vorperiode von 5 Tagen. Die Hauptperiode dauert 10 Tage.

2.1.2. Versuchskäfige:

Der Versuchskäfig ist eine Kunststoffbox mit einem Drahtnetzboden, der das automatische Sammeln von Kot bzw. von Kot und Harn-Gemisch in dem darunter stehenden Kunststofftopf ermöglicht (s. Abb. B 0). In dem Kunststofftopf befinden sich ca 100 ml 1n H_2SO_4 , um den Stickstoff zu fixieren und damit einen N-Verlust zu vermeiden.

Zum Sammeln des Harnes für die Verdaulichkeitsversuche wurde eine Blechrinne zwischen dem Käfig und dem ca 100 ml Kot-Sammelfläschchen vorgesehen. Der Harn tropft auf die Rinne und fließt in einen Kanal, der in ein Harn-Sammel-

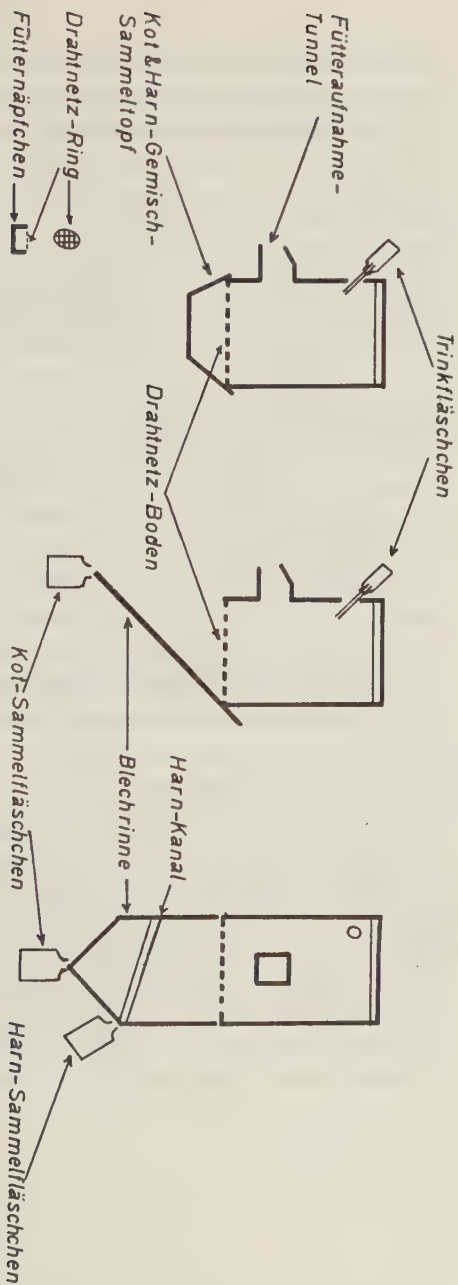


Abb B 0 Versuchskäfige

fläschchen führt. Der Kot rollt über die Rinne in das Kot-Sammelfläschchen. In dem Kot- bzw. in dem Harnsammelfläschchen befinden sich ebenfalls ca 20 ml 1 n H_2SO_4 .

Das Trinkwasser, das täglich erneuert wurde, wurde jeder Ratte durch ein ca 50 ml Kunststoff-Fläschchen mit einem Glasrohr zugeführt, so daß jede Ratte aus dem Trinkfläschchen beliebig viel Wasser saugen kann. Wie die meisten Nagetiere neigen auch die Ratten zum Verstreuen des vorgelegten Futters. Aus diesem Grund ist eine besondere Konstruktion für die Futteraufnahme vorgesehen worden. Es wurden Glasfutternäpfe mit einem über dem gemahlenden Futter liegenden Drahtnetz von 6 mm Maschenweite benutzt. Dadurch werden die Ratten gezwungen, das Futter mit dem Maul aufzunehmen und möglichst nicht mit Hilfe ihrer Pfoten. Auch der angebrachte Futteraufnahmetunnel trägt dazu bei, das Verstreuen des Futters zu verhindern.

2.1.3. Versuchstiere (die Ratten)

M i t c h e l l (1938) hat bereits die individuellen Unterschiede hinsichtlich des endogenen N-Verlusts und des Vermögens der N-Retention für ein reproduzierbares BW-Ergebnis unterstrichen. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Sicherheitsmaßnahmen beachtet, um diese physiologischen Einflüsse soweit wie möglich herabzusetzen:

- a) Nur Ratten mit einem Gewicht von 38 ± 2 g wurden in der Vorperiode eingesetzt.
- b) Für jede BW-Bestimmung wurden 10 Ratten für den N-Bilanzversuch und 5 Ratten für den Verdaulichkeitsversuch eingesetzt.
- c) Während der Vorperiode von 5 Tagen wurden solche Ratten ausgeschieden, die Futter verstreuen oder die eine Abweichung im Futterverzehr bzw. in der Gewichtszunahme aufweisen.
- d) Gewogen wurden die Ratten am Anfang der Vorperiode, sowie am Anfang und am Ende der Hauptperiode.
- e) Das Wiegen der Ratten erfolgt nach 6-stündiger Fastenzeit in nüchternem Zustand. Während der Fastenzeit wurden die Trinkwasserfläschchen und die Futternapfe entfernt.

2.1.4. Zusammensetzung des Versuchsfutters:

In Anlehnung an die Vorschläge der im "Arbeitskreis für Proteinbewertung" der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zusammengeschlossenen Institute ist das Versuchsfutter, wie in Tabelle B,1 angegeben, zusammengesetzt. Der Rohproteingehalt wurde mit 10 % gewählt und bei allen Versuchsfuttermischungen konstant gehalten. Die Menge an Reisstärke wurde je nach "ursprünglichem Rohproteingehalt" des untersuchten Proteins (Fischmehl) variiert.

Tab. B,1: DFG-Versuchsfutter

	in T.S. ‰
Rohprotein	10 ‰
Reisstärke	ca 77 ‰
Sonnenblumenöl	5 ‰
Zellulose DAB 6	4 ‰
Mineralmischung	3,5 ‰
Vitaminmischung	0,5 ‰
Zusammen	100,0 ‰

Die Zusammensetzung der Mineralstoffmischung und der Vitaminmischung für die BW-Versuche sind in den Tabellen B,2 bzw. B,3 dargestellt.

Tab. B,2: Die Mineralstoffmischung für BW

Komponent	für 100 g T.S.
KJ	0,5 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	1,5 "
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,6 "
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	14,0 "
MgCO_3	60,0 "
NaCl	750,0 "
CaCO_3	366,0 "
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2080,0 "
Zusammen	= 3277,0 mg
% in T.S.	= 3,277 g
Ca : P	= 2 : 1
Mischung ohne Ca und P	= 0,8316 ‰

Tab. B,3: Die Vitaminmischung für BW

Komponente		für 100 g T.S.
Biotin		0,01 mg
B ₆ Pyrodoxal		0,10 mg
K ₃ Menadion		0,10 mg
Folsäure		0,20 mg
Thiamin		0,20 mg
Riboflavin		0,20 mg
Rovimix A 40		1,25 mg
Ca-D Pantothenat		2,00 mg
Ascorbinsäure		2,00 mg
p-Aminobenzoesäure		5,00 mg
Nicotinsäureamid		5,00 mg
B ₁₂ Konzentrat		7,50 mg
Meso-Inosit		12,50 mg
Rovimix E ₂₅		20,00 mg
Cholinchlorid		200,00 mg
Zusammen		256,06 mg
% in T.S.	=	0,25606
Vitaminträger Laktose	=	0,2560 g
Vitaminmischung	=	0,502 %

2.1.5. Standardisierung der Versuchsfutter auf ein konstantes Ca : P

Wie aus Tabelle B,2 ersichtlich, beträgt das Ca : P Verhältnis in der Mineralmischung etwa 2 : 1. Bei der Berechnung des Ca : P-Verhältnisses in den untersuchten Fischmehl原因en ergab sich jedoch, daß dort das Verhältnis sehr vom Ausgangsmaterial, d. h. Filet, ganzer Fisch oder Abfall, abhängig ist. Während im Fischfilet ein Ca : P-Verhältnis von 0,25 : 1 zu finden ist, liegt dieses im ganzen Fisch bei 1,1 : 1, da besonders durch das Vorhandensein von Gräten ein Anstieg des Ca-Gehaltes eintritt. Im Fischabfall steigt sowohl der Gehalt an Ca als auch an P. In Bezug auf Fischfilet ist hier der Ca-Gehalt um das 25-fache, der P-Gehalt um das 4-fache gestiegen. Das führte zur Verschiebung des Ca : P-Verhältnisses auf 1,4 : 1. Es erwies sich daher als zweckmäßig, bei allen Versuchsfuttermischungen das Ca : P-Verhältnis konstant zu halten. Obwohl die Abfälle einen sehr hohen Ca- und P-Gehalt aufweisen, liegt ihr Ca : P-Verhältnis günstiger als im ganzen Fisch bzw. im Fischfilet. Eine Herabsetzung des Ca- und P-Gehaltes in den Abfallmehlen war nicht angebracht, sie mußte entweder auf Kosten des RP-Gehaltes erfolgen (geringere Fütterung) oder mit Hilfe von Ausfällungsmethoden, die das RP angreifen können.

Aus der Betrachtung der Tabelle B,4 ergibt sich, daß etwa 4 % des Ca- und 25 % des P-Gehaltes der Abfälle aus dem Fleischanteil der Abfälle stammen können. Um die 10 % RP ausschließlich von den Abfällen zu decken, ist in der fertigen Futtermischung mit 0,81 % Ca und

Tabelle B 4

Ca und P - Gehalt (und ihr Verhältnis) in den verschiedenen Fischmehlsorten

	Wasser im Fisch- mehl %	RP/T.S. im Fisch- mehl %	g T.S. für 1 kg	RP im Futter	g U.S. Fisch- mehl f. 1 kg	Ca/U.S. %	Ca/T.S. %	Ca/T.S. im Futter %	P/U.S. %	P/T.S. im Futter %	P/T.S. im Futter %	Ca : P im Futter
let Gt	9,83	90,36	110,67	10	121,54	0,2426	0,2664	0,02948	0,9366	1,0276	0,1137	0,26 : 1
let 40°C	9,31	89,45	111,79	10	122,20	0,2302	0,2516	0,02812	1,0550	1,1532	0,1289	0,21 : 1
let 70°C	8,60	89,30	111,90	10	121,50	0,2300	0,2490	0,02680	1,0050	1,0900	0,1219	0,24 : 1
let 100°C	6,90	89,40	111,80	10	119,40	0,2310	0,2460	0,02740	1,0580	1,1500	0,1137	0,23 : 1
nz Gt	10,22	81,71	122,38	10	134,89	3,004	3,5110	0,4052	2,70	2,9759	0,3642	1,11 : 1
nz 40°C	9,10	80,47	124,27	10	135,57	3,282	3,5806	0,4351	2,70	2,9457	0,3660	1,18 : 1
nz 70°C	7,79	80,04	124,95	10	135,68	3,252	3,5053	0,4579	2,80	3,0612	0,3824	1,11 : 1
nz 100°C	6,71	80,03	124,95	10	133,33	3,112	3,3206	0,4149	2,74	2,9238	0,3653	1,13 : 1
fall Gt	9,70	74,70	133,90	10	144,70	5,91	6,48	0,567	4,14	4,54	0,607	1,4 : 1
fall 40°C	8,40	74,14	134,90	10	146,20	5,90	6,38	0,862	3,86	4,17	0,562	1,5 : 1
fall 70°C	7,20	74,20	134,70	10	144,40	5,46	5,95	0,801	3,86	4,13	0,556	1,4 : 1
fall 100°C	6,30	74,27	134,7	10	143,10	5,55	5,85	0,787	3,88	4,12	0,555	1,4 : 1
X				10								

Tabelle B 5 - Standardisierung des Ca : P Verhältnisses in den verschiedenen Futtermischungen

	Ca T.S.im Futter %	P T.S.im Futter %	Ca : P im Futter	Ca auf 0,5 %	P auf 0,5% Ca	P Zusatz %	Ca % Zusatz v. CaHPO ₄	Ca % Netto- Zusatz	CaCO ₃ % erforderl. Zusatz	Ca : P
Filet Gt	0,02948	0,1137	0,26:1	0,5124	0,3660	0,2523	1,3963	0,1895	0,4738	1,4 : 1
Filet 40°C	0,02812	0,1289	0,21:1	0,5124	0,3660	0,2371	1,2823	0,2158	0,5395	1,4 : 1
Filet 70°C	0,02830	0,1219	0,2 : 1	0,5124	0,3660	0,2441	1,3021	0,2110	0,5275	1,4 : 1
Filet 100°C	0,02740	0,1187	0,2 : 1	0,5124	0,3660	0,2473	1,3374	0,2031	0,5077	1,4 : 1
ganz Gt	0,4052	0,3642	1,11:1	0,5124	--	--	--	0,0972	0,2430	1,4 : 1
ganz 40°C	0,4351	0,3660	1,18:1	0,5124	--	--	--	0,0773	0,1942	1,4 : 1
ganz 70°C	0,4379	0,3824	1,11:1	0,5353	--	--	--	0,0974	0,2432	1,4 : 1
ganz 100°C	0,4149	0,3653	1,13:1	0,5124	--	--	--	0,0975	0,1939	1,4 : 1
Abfall Gt	0,8670	4,54	1,4 : 1	--	--	--	--	--	--	--
Abfall 40°C	0,862	4,17	1,5 : 1	--	--	--	--	--	--	--
Abfall 70°C	0,801	4,13	1,4 : 1	--	--	--	--	--	--	--
Abfall 100°C	0,787	4,12	1,4 : 1	--	--	--	--	--	--	--
FM X				--	--	--	--	--	--	--

0,57 % P zu rechnen. Dieser Ca-Gehalt liegt höher als der bei Zuchtfutter übliche Ca-Gehalt von 0,5 %. Ein Ca : P Verhältnis von 1,4 : 1 (wie es beim Abfall vorliegt) ist für Ca- und P-reiches Futter noch günstig und erlaubt eine ausreichende Ca- und P-Resorption [B r u n e und G ü n t h e r (1961)].

Aus diesem Grunde wurde der Ca- und P-Gehalt des Ganzfischmehls bzw. des Filetmehls durch Zugabe von CaCO_3 und CaHPO_4 auf 0,5 % Ca eingestellt. Dadurch wurde das Ca : P Verhältnis auf 1,4 : 1 standardisiert, um ein konstantes Ca : P Verhältnis in allen Fischmehl Futtermischungen zu erhalten (s. Tabelle B,4 und B,5).

2.1.6. Zubereitung des Versuchsfutters

Die Komponenten jeder Futtermischung wurden einzeln eingewogen. Zuerst wurden die Reisstärke, die Zellulose und das Fischmehl zusammen gemischt; darauf erfolgte die Zugabe der Vitaminmischung und eine nochmalige Durchmischung. Zum Schluß wurden die Mineralstoffmischung (ohne Ca und P) sowie die jeweils berechnete Menge CaCO_3 und CaHPO_4 zugesetzt. Die fertige Mischung wurde mit Sonnenblumenöl (5 %) durchtränkt und noch einmal durchgemischt. Das fertige Versuchsfutter wurde anschließend mit der Hand durch ein Sieb von 1 mm Maschenweite gerieben. Jede Mischung muß mindestens 3 bis 5 mal durchgesiebt werden. Die fertigen Futtermischungen wurden in 2 kg Futterbehältern im Kellerraum aufbewahrt.

Auf ähnliche Weise wurden die Vitamin- und die Mineralstoffmischungen vorbereitet. Da von diesen relativ geringe Mengen erforderlich sind,

wurden die Mischungen jeweils für 10 kg T.S. berechnet, zusammengemischt und kühl aufbewahrt.

Die Ratten erhielten das vorbereitete Futter in trockener Form. Für jede Ratte wurde die Futtermenge in eine Tüte eingewogen (50 g für die Vorperiode und 100 g für die Hauptperiode).

2.2. Der N-freie Versuch

2.2.1. Ermittlung der Höhe des NEB und des DVN

Wie bereits erwähnt, wurde in dieser Arbeit für die Grundumsatzermittlungen nach dem Prinzip von C o l u m b u s (1954) vorgegangen. Für die N-Grundumsatz-Bestimmung wurden insgesamt 30 Ratten in folgende drei Gewichtsklassen eingeteilt:

I: 63 ± 3 g; II: 55 ± 2 g; III: 50 ± 2 g.
Diese Gewichte wurden gewählt, weil sie etwa dem Mittelgewicht der Ratten in den Bilanz- und Verdaulichkeitsversuchen entsprechen. Die Ratten wurden zuerst mit Zuchtfutter gefüttert, bis sie die gewünschten Gewichte erreicht hatten.

Von jeder Gewichtsklasse wurden mindestens vier Ratten für die NEB-Bestimmung eingesetzt.

2.2.2. Versuchsdauer

Es ist unbestritten, daß der N-freie-Versuch für die Versuchsratten eine anstrengende Periode ist. Die Vorperiode muß dabei 3 Tage dauern, um den Verdauungskanal der Tiere von dem vorherigen Futter zu entleeren. Die Dauer der Hauptperiode darf nicht zu lange ausge-

dehnt werden, da die Futteraufnahmebereitschaft des Tieres um so schlechter wird, je länger die Hauptperiode dauert. Auch das Gewicht des Tieres leidet darunter. Im Verlauf dieser Arbeit wurde beobachtet, daß die Tiere während der Hauptperiode etwa 5 bis 7 % an Gewicht verlieren. Aus diesem Grunde wurde die Hauptperiode auf 4 Tage beschränkt. Während dieser 4 Tage wurde der Kot bzw. das Kot-Harn-Gemisch auf ähnliche Weise gesammelt, wie bei den N-Bilanz- und Verdaulichkeitsversuchen beschrieben. Das Wiegen der Ratten erfolgte im nüchternen Zustand nach 6-stündiger Fastenzeit. Die Ratten, die während der Vorperiode zu viel an Gewicht verloren oder nicht genügend Futter aufgenommen hatten, wurden in der Hauptperiode nicht eingesetzt.

2.2.3. Versuchsfutter

Bei der Herstellung der N-freien Grundfuttermischung wurden dieselben Komponenten verwendet wie bei der Herstellung des N-Bilanz- und Verdaulichkeits-Versuchsfutters, jedoch ohne Proteinbeigabe. Um das Futter schmackhafter zu machen, wurden 10 % Zucker und 1 % NaCl zugesetzt.

2.2.4. Futteraufnahme

In der Hauptperiode wurde folgende Futteraufnahme (Durchschnittswerte) festgestellt:

- a) Tiere der Klasse I (mit einem Einsatzgewicht von 63 g): 6,25 g T.S. Futter pro Tier und Tag;
- b) Tiere der Klasse II (mit einem Einsatzgewicht von 55 g): 5,85 g T.S. Futter pro Tier und Tag;

- c) Tiere der Klasse III (mit einem Einsatzgewicht von 50 g): 5,65 g T.S. Futter pro Tier und Tag.

2.2.1. Raumtemperatur

Der benutzte Rattenstall war mit einem automatischen Wärmeregulator ausgestattet. Es wurde darauf geachtet, daß die Raumtemperatur bei 22° C konstant blieb. Nach C o l u m b u s (1954) tritt bei Erniedrigung der Versuchstemperatur auf 16° C eine verdoppelte EHN-Ausscheidung ein, ab 24° C verringert sich die Freßlust der Versuchsratten.

2.2.6. Vorbereitung der N-Analyse

Nach Beendigung des N-freien Fütterungsversuches wurden die Kotsammelfläschchen und die Harn- und Kot-Sammeltöpfe sofort für die N-Analyse vorbereitet. Zuerst wurde der Kot bzw. das Kot/Harn-Gemisch mit aqua dest. in ein Becherglas überspült und in einem Homogenisator (Ultraturrax) etwa 2 bis 3 Min. vorsichtig homogenisiert. Zur Vermeidung von N-Verlusten muß darauf geachtet werden, daß das Gemisch dabei nicht warm wird. Danach wurde das Gemisch mit aqua dest. quantitativ in eine Kunststoffflasche gebracht und gewogen. Die Flaschen werden danach gut verschlossen und bis zur Analyse in einem Kellerraum aufbewahrt.

2.2.7. Berechnung von DVN und NEB

Aus den folgenden Tabellen B,6 und B,7 geht hervor, daß die durchschnittlichen Werte für die endogene N-Ausscheidung für:

Tabelle B 6 : Berechnete und gefundene DVN

Ratte No	Kot- Gemisch	% N	mg N Aus- scheidung	mg N pro Tag	Mittel Gew.	mg/g Gew./ Tag
y 6	90,0	0,0342	30,0	7,75	61,50	0,1260
y 1	82,5	0,0314	25,9	6,48	63,25	0,1025
y 3	89,0	0,0330	29,3	7,32	63,50	0,1152
y 13	89,9	0,0309	27,8	6,94	59,75	0,1161
y 4	81,7	0,0290	23,7	5,88	57,50	0,1023
y 17	80,7	0,0310	25,0	6,25	52,60	0,1188
y 25	87,0	0,0302	26,0	6,50	55,00	0,1181
y 29	81,7	0,0311	25,4	6,35	54,25	0,1171
y 18	110,2	0,0206	22,7	5,67	49,00	0,1157
y 19	81,0	0,0332	26,9	6,73	50,50	0,1332
y 20	80,9	0,0291	23,5	5,88	48,25	0,1219
y 25	72,3	0,0327	23,7	5,68	47,50	0,1195
Durchschnittliche DVN/ g Gew./Tier/Tag						0,1171

Tabelle B 7 :

Berechnete und gefundene NEB

Ratte No	Kot + Harn- Gemisch	% N	mg N Aus- scheidung	mg N pro Tag	Mittel Gew.	mg/g Gew./ Tag
y 5	140,5	0,0637	89,49	22,37	58,5	0,3824
y 6	145,2	0,0613	89,00	22,25	60,5	0,3678
y 8	134,7	0,0689	92,80	23,20	60,0	0,3866
y 9	154,5	0,0592	91,20	22,80	59,0	0,3864
y 11	132,7	0,0603	80,02	20,0	54,0	0,3704
y 12	143,8	0,0550	79,09	19,77	50,5	0,3915
y 14	141,3	0,0608	85,92	21,48	56,5	0,3810
y 22	159,2	0,0521	83,12	20,78	53,0	0,3920
y 10	152,5	0,0501	76,40	19,10	48,5	0,3938
y 16	123,2	0,0658	81,07	20,27	49,0	0,4136
y 21	161,3	0,0438	70,65	17,66	45,0	0,3924
y 23	144,8	0,0499	72,26	18,06	47,50	0,3802
Durchschnittliche NEB/g Gew./ Tier/ Tag						0,3865

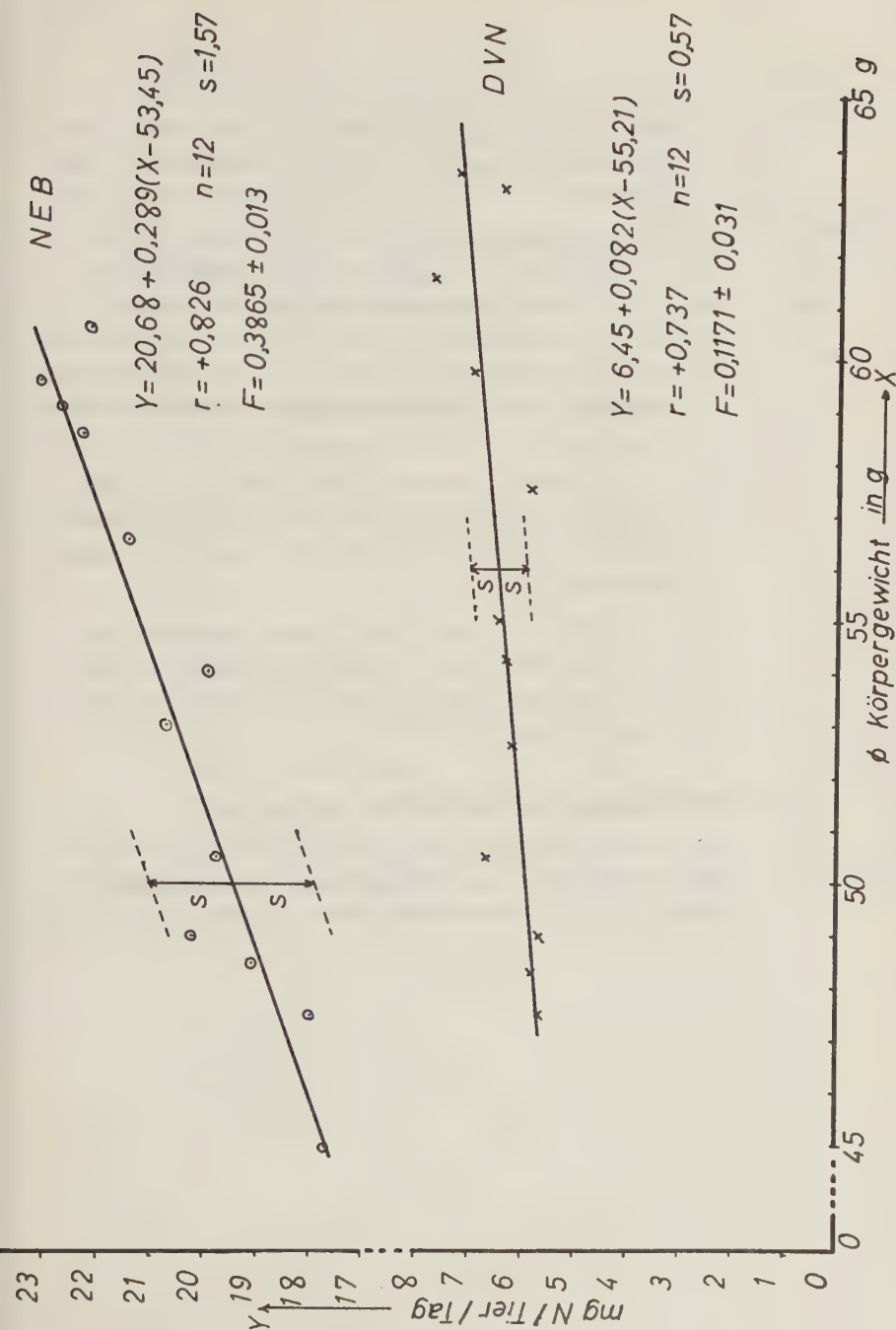


Abb. B 1 Der Zusammenhang zwischen dem Endogen-N und dem Körpergewicht

DVN = $0,1171 \pm 0,0135$ mg N / g Gewicht / Tag
NEB = $0,3865 \pm 0,0135$ mg N / g Gewicht / Tag
betragen.

Die Berechnung der BW erfolgte nach dem Vorschlag von C o l u m b u s (vgl. unter 1.4.). Eine Bestimmung des EHN ist danach nicht erforderlich, deshalb wurde auch in dieser Arbeit darauf verzichtet. Die durchgeführten DVN- bzw. NEB-Bestimmungen haben außerdem den Vorteil, daß sie weniger empfindlich sind.

Die Berechnung von DVN bzw. NEB erfolgt mit Hilfe der oben genannten Faktoren (vgl. Tabellen B,6 und B,7 bzw. Abb. B,1) nach folgenden Formeln:

DVN = $0,1171 \cdot G$ mg N pro Tier und Tag
NEB = $0,3865 \cdot G$ mg N pro Tier und Tag
G = das Mittelgewicht der Ratte während der Hauptperiode.

2.3. Fehlerquellen bei der Berechnung der BW

In Tabelle B,8 sind die bei den eigenen Versuchen gefundenen NEB- und DVN-Werte den rechnerisch (nach 2.2.7.) ermittelten Daten gegenübergestellt worden.

Tab. B 8: Gegenüberstellung der rechnerisch und experimentell erhaltenen NEB- und DVN-Werte

NEB/Tier/Tag				DVN/Tier/Tag			
Mittel- gew. g	errech- net mg	gefun- den mg	Diff. %	Mittel- gew. g	errech- net mg	gefun- den mg	Diff. %
45,0	17,39	17,66	-1,5	47,50	5,56	5,68	- 2,1
47,5	18,35	18,06	+1,6	48,25	5,65	5,88	- 3,9
48,5	18,74	19,10	-1,9	49,00	5,74	5,67	+ 1,2
49,0	18,94	20,27	-6,6	50,50	5,92	6,73	- 9,0
50,5	19,52	19,77	-1,3	52,60	6,16	6,25	- 1,4
53,0	20,48	20,78	-1,4	54,25	6,35	6,35	0
54,0	20,87	20,00	+4,4	55,00	6,44	6,50	- 0,9
56,0	21,64	21,48	+0,7	57,50	6,73	5,88	+14,0
58,5	22,61	22,37	+1,0	59,75	6,99	6,94	+ 0,7
59,0	22,80	22,80	0	61,50	7,20	7,75	- 7,1
60,0	23,19	23,20	-0,04	63,25	7,41	6,48	+14,3
60,5	23,44	22,25	+0,85	63,50	7,43	7,32	- 1,5

Es ist daraus zu entnehmen, daß die berechneten und die gefundenen Daten recht gut übereinstimmen. Im allgemeinen zeigen die NEB-Daten kleinere Differenzen als die DVN-Daten. Das ist auf zwei Gründe zurückzuführen:

- a) Im NEB (EHN + DVN) ist ein Anteil (EHN) enthalten, der vom Gewicht des Tieres abhängiger ist als DVN alleine. Das konnte auch anhand der Statistik bewiesen werden. Der Korrelationskoeffizient zwischen NEB und G beträgt $r = + 0,826$, zwischen DVN und G ist $r = + 0,737$. Beide können als gesichert gelten, ($P < 0,01$), da die Zufallsgrenze ($t 0,05, 10$) mindestens 0,58 betragen muß. Die Zufallshöchstwerte für r sind der Tafel 5 im "Grundriß der biologischen Statistik" von Weber (1964) entnommen worden.
- b) Die Empfindlichkeit der N-Bestimmung: Bei der Ermittlung der NEB liegt der N-Gehalt der Analysenmischung bei 0,06 %, bei der DVN-Analysenmischung bei 0,03 %. Bei kleinerem N-Gehalt ist der analytische Fehler größer. Obwohl die höchste DVN-Abweichung + 14,3 % beträgt und die höchste NEB-Abweichung - 6,6 %, machen diese Abweichungen im Endergebnis bei der Berechnung der BW weniger als ± 1 % aus. Diese Differenzen dürften also bei der Berechnung der BW nicht von ausschlaggebender Bedeutung sein.

Eine weitere Fehlerquelle bei der BW-Berechnung ist auf die Kot-N-Ermittlung zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kot-N-Menge nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Kot N} = \frac{100 - sV}{100} \cdot Ne$$

sV = die scheinbare Verdaulichkeit

Ne = N-Einnahme

Tabelle B 9 zeigt, wie weit diese berechnete von der gefundenen Kot N-Menge abweicht. Für diese Tabelle wurden Daten von den Verdaulichkeitsversuchen benutzt. Es ist ersichtlich, daß ein Drittel der berechneten Daten eine Abweichung von $> \pm 10 \%$ zeigen. Diese hohen Abweichungen können im Endergebnis bei der Berechnung der BW Differenzen bis zu $\pm 2 \%$ verursachen.

Tab. B 9: Gegenüberstellung der berechneten und der gefundenen Kot-N-Mengen

Probe	Verd. %	Gefunden mg	berechnet mg	Diff. mg	Diff. %
Filet Gt	92,78	110	119	+ 9	+ 8,2
		98	86	-12	-12,2
		99	95	- 3	- 3,1
		84	80	- 4	- 4,7
		98	128	+30	+33,1
Filet 40°C	91,82	109	120	+11	+10,1
		98	119	+21	+21,2
		131	108	-23	-17,5
		131	117	-14	-10,6
		112	119	+ 7	+ 6,2
Filet 70°C	91,15	113	102	-11	-9,8
		118	120	+ 2	+ 1,7
		110	133	+23	+20,9
		112	131	+10	+ 8,9
Filet 100°C	89,36	134	164	+30	+22,5
		108	148	+40	+37,0
		150	143	- 7	- 4,7
		218	170	-48	-22,0
		184	165	-19	-10,3

Tab. B 9 Fortsetzung

Probe	Verd. %	Gefunden mg	berechnet mg	Diff. mg	Diff. %
Ganz Gt.	90,29	150	150	0	0
		146	151	+ 5	+ 3,4
		188	188	0	0
Ganz 40°C	89,07	138	122	-16	-11,6
		102	110	+ 8	+ 7,8
		106	111	+ 5	+ 4,7
Ganz 70°C	90,97	107	106	- 1	- 0,9
		150	139	-11	- 7,3
		96	99	+ 3	+ 3,1
Ganz 100°C	90,33	151	153	+ 2	+ 1,3
		127	118	- 9	- 7,0
		139	143	+ 4	+ 2,8
Abfall Gt.	88,84	183	171	-12	- 6,6
		133	140	+ 7	+ 5,3
		142	145	+ 3	+ 2,1
Abfall 40°C	88,05	169	154	-15	- 8,9
		189	180	- 9	- 4,7
		180	189	+ 9	+ 5,0
Abfall 70°C	90,21	122	115	- 7	- 5,7
		164	159	- 5	- 3,0
		135	135	0	0
Abfall 100°C	86,20	239	201	-38	-15,9
		209	172	-37	-17,7
		209	178	-31	-14,8
FMX	88,9	122	141	+19	+15,5
		203	153	-50	-24,6
		121	121	0	0

2.4. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit die einfache Varianzanalyse (F-Test) und die Signifikanzanalyse (T-Test) herangezogen (Weber, 1964: Grundriss der biologischen Statistik). Sie soll an folgendem Beispiel erläutert werden:

2.4.1. Der F-Test

Aus der Varianzanalyse der Futteraufnahmebereitschafts-Daten (Vergl. 2.5.) ergab sich:

Variabilität	SAQ	FG	MQ
Insgesamt	5,81	11	-
Zwischen den Gruppen	0,56	2	$0,28 = M_1$
Innerhalb der Gruppen	5,25	9	$0,58 = M_0$

$$F = \frac{M_1}{M_0} = \frac{0,28}{0,58} = 0,5$$

SAQ = Summe der Abweichungsquadrate

FG = Freiheitsgrade

MQ == Mittlere Quadrate

Der berechnete F-Wert beträgt 0,5 und liegt somit weit unter den folgenden "statistischen Grenzwerten" für $P < 0,05$ und $P < 0,01$. [nach Weber (1964) Tabellenanhang Tafel 6].

$$F_{2, 9, 0,05} = 4,26$$

$$F_{2, 9, 0,01} = 8,02$$

Diese statistischen Grenzwerte sind vom FG zwischen den Gruppen und vom FG innerhalb der Gruppen abhängig.

Ist der berechnete F-Wert kleiner als die gefundenen Grenzwerte, so ist die Variabilität zwi-

schen den Gruppen kleiner als diejenige innerhalb einer Gruppe. Das bedeutet, daß die Daten als homogen betrachtet werden können. Die Hypothese $\sigma^2 = 0$ ist folglich anzunehmen.

Ist der berechnete F-Wert größer als die gefundenen Grenzwerte, so ist die Variabilität zwischen den Gruppen größer als diejenige innerhalb der Gruppe und kann deshalb nicht durch Zufallseinflüsse erklärt werden. Das bedeutet, daß die Daten nicht als homogen betrachtet werden können. Die Hypothese $\sigma^2 = 0$ ist folglich abzulehnen.

Liegt der berechnete F-Wert zwischen den gefundenen Grenzwerten, so sind die Daten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($P < 0,05$) nicht als homogen anzusehen. Das reicht aber nicht aus, um die Daten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % ($P < 0,01$) als homogen betrachten zu können.

2.4.2. Der T-Test

Die Anwendung des T-Tstes beim Prüfen einer Hypothese über die Differenz zwischen zwei unabhängigen Normalverteilungen, bei denen die Varianzen der Normalverteilungen unbekannt sind, erfolgt nach S t u d e n t Vergl.

W e b e r (1964) :

$$t = \frac{\bar{x}' - \bar{x}''}{sd} \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

$$\text{dabei ist } sd^2 = \frac{(\sum x_i' - \bar{x}')^2 + (\sum x_i'' - \bar{x}'')^2}{(n_1 + n_2) - 2}$$

Der berechnete t-Wert wird mit dem Zufallshöchstwert für t verglichen. Diese Zufallshöchstwerte für t sind aus Tafel 5 des Tabel-

lenanhangs W e b e r (1964) zu entnehmen. Sie sind vom Freiheitsgrad ($n - 2$) und der Irrtumswahrscheinlichkeit P abhängig.

Voraussetzung für ein statistisch gesichertes Ergebnis ist, daß der berechnete t -Wert den Zufallshöchstwert für t (t , FG) überschreitet.

2.5. Einfluß von Ca und P auf ΔG und PER

In einem Nebenversuch wurden drei Casein + Methionin Futtermischungen, bei denen alle anderen Komponenten (wie Fett, RP, Kohlenhydrate etc.) konstant gehalten wurden durch Zusätze von CaCO_3 und CaHPO_4 wie folgt:

- a) Ca-Gehalt 0,5 %; das Ca:P Verhältnis wurde auf 1,4 : 1 eingestellt. Diese Bedingungen entsprechen den standardisierten Ganzfisch- und Filetmehlen (Vergl. B 2.1.5.).
- b) Ca-Gehalt 0,8 %; das Ca:P Verhältnis wurde ebenfalls auf 1,4 : 1 eingestellt, um die Bedingungen im Abfallmehl herzustellen.
- c) Ein Kontrollfutter wurde auf einen Ca-Gehalt von 0,2 % und ein Ca:P von 2 : 1 eingestellt.

Für jede dieser Futtermischungen wurden 5 Ratten eingesetzt, die Versuchsdauer betrug jeweils 15 Tage.

Aus den in Tabelle B 10 aufgeführten Ergebnissen ist zu ersehen, daß zwischen den 3 Gruppen kein Unterschied in der Futteraufnahmebereitschaft der Tiere besteht. Das wurde auch statistisch bestätigt. Weder durch den F-Test noch durch den T-Test konnte eine gesicherte Differenz festgestellt werden:

Der <u>F-Wert</u> beträgt:	Die <u>Grenzwerte</u> :
0,50	F 2, 9, 0,05 = 4,26 ($P < 0,05$)
	F 2, 9, 0,01 = 8,02 ($P < 0,01$)

Der <u>t-Wert</u> zwischen Gruppe b u. c beträgt:	<u>Zufallshöchstwert</u>
0,99	t 0,05, 6 = 2,45 ($P < 0,05$)

Aus der Analyse der ΔG -Daten ergab sich ein F-Wert von 17 . Der berechnete F-Wert ist damit wesentlich größer als die beiden statistischen Grenzwerte. Das bedeutet, daß die ΔG -Daten nicht als homogen betrachtet werden können ($P < 0,01$).

Aus der Analyse der PER-Daten ergab sich ein F-Wert von 5,66 . Der berechnete Grenzwert liegt zwischen den beiden Grenzwerten, d. h. die PER-Daten können bei $P < 0,05$ nicht als homogen bezeichnet werden. Aus dem T-Test ergab sich ebenfalls, daß zwischen Gruppe b und c ein signifikanter Unterschied bei $P < 0,05$ besteht. Der berechnete t-Wert t 0,05, 6 beträgt 2,84 .

Tabelle B 10 zeigt weiter, daß die PER-Daten und ΔG -Daten der Gruppe c 13 % bzw. 11 % höher liegen als die PER- und ΔG -Daten der Gruppe a bzw. b .

Aus diesen Ergebnissen sind folgende Schlußfolgerungen zu ziehen:

- Wenn das Futter einen ausreichenden Gehalt an Ca und P aufweist, ist nicht der absolute Gehalt dieser beiden Mineralstoffe der ausschlaggebende Faktor, sondern das Ca:P-Verhältnis.
- Die Verschiebung des Ca:P-Verhältnisses von 2 : 1 nach 1,4 : 1 hat keinen negativen Einfluß auf die Futteraufnahmebereitschaft der Tiere.

- c) Die Verschiebung des Ca:P-Verhältnisses kann jedoch zu einem negativen Einfluß auf die Proteinverwertung (PER) und auf die Gewichtszunahme (ΔG) führen ($P < 0,05$).

2.6. Einfluß der Trocknungstemperatur auf die biologischen Bewertungsmaßstäbe

Die Ergebnisse der Fütterungsversuche mit den bei verschiedenen Temperaturen getrockneten Fischmehlen sind in der Tabelle B 11 zusammengefaßt. Im Einzelnen ist daraus zu entnehmen:

2.6.1. Einfluß der Trocknungstemperatur auf PER

Die statistische Analyse der PER-Daten ergab:

- a) Bei den Filetmehlen weist das gefriergetrocknete Mehl (Filet Gt) ein kleineres PER-Defizit auf als das vakuumgetrocknete (Filet 40° C). Dieser Unterschied ist nach dem T-Test signifikant ($P < 0,001$). Der berechnete t-Wert beträgt 8,5 und ist wesentlich größer als der Zufallshöchstwert von $t_{0,001, 22} = 3,79$. Zwischen "Filet 40° C" und "Filet 70° C" ist dagegen kein signifikanter Unterschied festzustellen, da der berechnete t-Wert nur 0,63 beträgt. Sie sind also von den Tieren besser verwertet worden als das gefriergetrocknete Filetmehl. Das kann durch den Einfluß der Hitzebehandlung (Aufschluß) auf das native Muskelprotein erklärt werden.
- b) Die Ganzfischmehle verhielten sich etwas anders, denn hier konnte kein signifikanter Unterschied der vier Mehle festgestellt werden:

Tabelle B 11 - Zusammenfassende Tabelle

	P E R	ΔG	scheinbare Verdaulichkeit	wahre Verdaulichkeit	B W
Filet G.T.	4,10 $\pm$ 0,28	3,8 $\pm$ 0,48	92,78 $\pm$ 0,79	99,72 $\pm$ 0,75	88,65 $\pm$ 3,42
Filet 40°C	4,60 $\pm$ 0,44	4,0 $\pm$ 0,37	91,82 $\pm$ 1,47	98,01 $\pm$ 0,38	88,39 $\pm$ 3,18
Filet 70°C	4,25 $\pm$ 0,41	3,8 $\pm$ 0,40	91,15 $\pm$ 1,45	98,00 $\pm$ 0,59	88,23 $\pm$ 2,63
Filet 100°C	4,34 $\pm$ 0,27	3,9 $\pm$ 0,36	89,36 $\pm$ 2,42	95,54 $\pm$ 2,70	79,92 $\pm$ 3,23
ganz G.T.	4,29 $\pm$ 0,24	3,7 $\pm$ 0,29	90,29 $\pm$ 1,02	94,98 $\pm$ 0,83	82,12 $\pm$ 1,80
ganz 40°C	3,98 $\pm$ 0,44	3,8 $\pm$ 0,30	89,07 $\pm$ 1,97	96,28 $\pm$ 1,20	81,11 $\pm$ 1,57
ganz 70°C	3,94 $\pm$ 0,45	3,8 $\pm$ 0,33	90,97 $\pm$ 1,45	96,50 $\pm$ 1,93	77,98 $\pm$ 2,39
ganz 100°C	4,05 $\pm$ 0,36	3,8 $\pm$ 0,50	90,33 $\pm$ 0,75	96,17 $\pm$ 0,33	75,29 $\pm$ 2,98
Abfall G.T.	3,80 $\pm$ 0,44	3,9 $\pm$ 0,42	88,84 $\pm$ 0,74	94,66 $\pm$ 0,75	75,59 $\pm$ 2,90
Abfall 40°C	3,52 $\pm$ 0,26	3,5 $\pm$ 0,46	88,05 $\pm$ 1,19	93,39 $\pm$ 1,07	72,67 $\pm$ 4,46
Abfall 70°C	3,46 $\pm$ 0,23	3,2 $\pm$ 0,41	90,21 $\pm$ 0,77	96,32 $\pm$ 0,87	72,17 $\pm$ 2,50
Abfall 100°C	3,15 $\pm$ 0,27	2,5 $\pm$ 0,37	86,20 $\pm$ 3,56	92,63 $\pm$ 3,31	71,94 $\pm$ 3,31
Fischmehl X	3,09 $\pm$ 0,32	2,1 $\pm$ 0,17	88,94 $\pm$ 2,33	96,25 $\pm$ 1,21	71,25 $\pm$ 1,96
Casein * Meth.	2,52 $\pm$ 0,15	1,1 $\pm$ 0,02	87,10 $\pm$ 5,0	97,84 $\pm$ 5,37	69,10 $\pm$ 2,35

Fortsetzung Tabelle B 11 - Zusammenfassende Tabelle

	N P U	N P U m	N P U g	N - Bilanz %
Filet G.T.	88,36 $\pm$ 2,87	20,4 $\pm$ 1,35	67,9 $\pm$ 2,96	66,5 $\pm$ 3,89
Filet 40° C	86,63 $\pm$ 3,17	19,4 $\pm$ 0,60	67,2 $\pm$ 2,93	68,5 $\pm$ 3,88
Filet 70° C	86,53 $\pm$ 2,53	21,2 $\pm$ 0,62	65,3 $\pm$ 2,40	65,0 $\pm$ 2,54
Filet 100°C	74,17 $\pm$ 2,98	20,2 $\pm$ 1,57	53,9 $\pm$ 2,64	56,6 $\pm$ 2,89
ganz G.T.	78,01 $\pm$ 1,42	20,1 $\pm$ 1,19	57,8 $\pm$ 1,25	59,0 $\pm$ 1,54
ganz 40° C	78,93 $\pm$ 1,18	18,8 $\pm$ 1,78	60,1 $\pm$ 2,07	60,5 $\pm$ 2,47
ganz 70° C	75,25 $\pm$ 2,82	20,1 $\pm$ 2,47	55,0 $\pm$ 4,55	54,4 $\pm$ 4,93
ganz 100°C	72,58 $\pm$ 2,99	19,4 $\pm$ 1,92	52,8 $\pm$ 2,65	52,8 $\pm$ 2,78
Abfall G.T.	72,28 $\pm$ 2,39	18,7 $\pm$ 1,84	54,9 $\pm$ 2,06	53,8 $\pm$ 2,79
Abfall 40° C	67,58 $\pm$ 4,21	18,1 $\pm$ 0,91	49,3 $\pm$ 3,72	49,8 $\pm$ 3,78
Abfall 70° C	69,65 $\pm$ 1,55	19,2 $\pm$ 1,13	50,6 $\pm$ 1,42	50,3 $\pm$ 1,47
Abfall 100°C	68,69 $\pm$ 3,48	18,2 $\pm$ 0,47	49,3 $\pm$ 3,75	46,5 $\pm$ 2,89
Fischmehl X	68,97 $\pm$ 1,53	19,4 $\pm$ 3,64	49,5 $\pm$ 2,02	49,1 $\pm$ 1,78
Casein + Meth.	66,00 $\pm$ 2,45	27,0 $\pm$ 1,70	37,4 $\pm$ 1,17	40,7 $\pm$ 1,0

Zwischen Ganzfisch	und	Ganz- fisch	beträgt der be- rechnete t-Wert	Zufalls- höchstwert
Gt		40°C	2,08	t0,05,20=2,09
40°C		70°C	0,89	t0,05,19=2,09
70°C		100°C	0,56	t0,05,22=2,07

- c) Bei den Abfallmehlen ergab sich zwar zwischen "Abfall Gt", "Abfall 40° C" und "Abfall 70° C" ebenfalls kein signifikanter Unterschied:

Zwischen Abfall	und	Abfall	beträgt der be- rechnete t-Wert	Zufalls- höchstwert
Gt		40°C	1,83	t0,05,20=2,09
40°C		70°C	0,59	t0,05,20=2,09

dagegen wurde bei Trocknungstemperaturen über 70° C ein PER-Defizit festgestellt. Bei 70° C scheint also der Bereich der kritischen Trocknungstemperatur zu liegen. Dieses Defizit ist statistisch signifikant ($P < 0,05$):

Zwischen Abfall	und	Abfall	beträgt der be- rechnete t-Wert	Zufalls- höchstwert
70°C		100°C	<u>2,9</u>	t0,05,20=2,09
70°C		85°C	<u>3,1</u>	t0,01,20=2,85
85°C		100°C	1,52	t0,05,20=2,09

Aus der Betrachtung der PER Daten ergibt sich in folgender Reihenfolge eine bessere Verwertung der Fischproteine durch die Versuchstiere: Filet-> Ganzfisch-> Abfallprotein. Die festgestellten Unterschiede zwischen den drei Proteinen sind allerdings klein, so daß es hier angebracht erscheint, einen Homogenität-Test (F-Test) vorzunehmen.

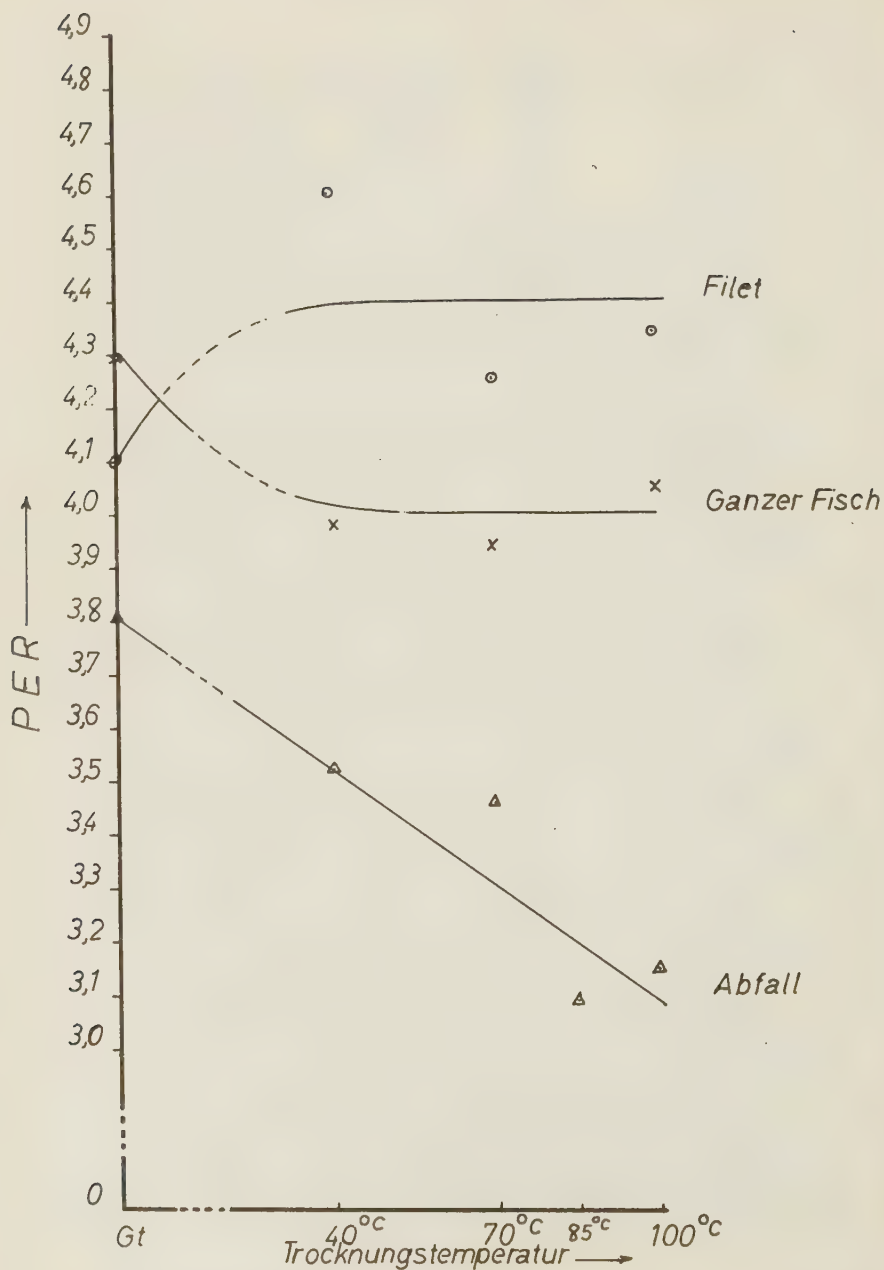


Abb B2 Einfluß der Trocknungstemperatur auf PER

Aus der Analyse der PER-Daten (Ganzfisch 40° C, 70° C, 100° C und Filet Gt, 70° C, 100° C) ergab sich ein F-Wert von 2,44. Der berechnete F-Wert liegt zwischen den beiden Grenzwerten:

$$F_{5, 64, 0,05} = 2,37$$

$$F_{5, 64, 0,01} = 3,33$$

Das bedeutet, daß die Unterschiede zwischen den PER-Daten der Filetproteine und den PER-Daten der Ganzfischproteine statistisch gesichert sind ($P < 0,05$). Zwischen den PER-Daten der Ganzfischproteine und der Abfallproteine sind die Unterschiede noch deutlicher und signifikanter ($P < 0,01$), da sich aus der Analyse der PER-Daten (Ganzfisch 40° C, 70° C, 100° C und Abfall Gt, 40° C, 100° C) ein F-Wert von 4,01 ergab.

Dieser F-Wert ist größer als beide Grenzwerte:

$$F_{5, 61, 0,05} = 2,37$$

$$F_{5, 61, 0,01} = 3,34$$

Aus der statistischen Analyse der PER-Daten können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

- a) Bei den Filetmehlen ist nur das "Filet Gt" etwas weniger von den Tieren ausgenutzt worden ($P < 0,01$). Alle erhitzten Filetproben weisen höhere PER-Daten auf, folglich ist kein negativer Einfluß der Trocknungstemperatur festzustellen.
- b) Bei den Ganzfischmehlen war kein Einfluß der Trocknungstemperaturen festzustellen.
- c) Bei den Abfallmehlen lag bei 70° C die kritische Trocknungstemperatur ($P < 0,01$).
- d) Bei Zusatz von Filetmehl (mit Ausnahme von Filet Gt) wird das Futter durch die Tiere etwas besser verwertet als mit Zusatz von Ganzfischmehl ($P < 0,05$).
- e) Bei Zusatz von Ganzfischmehl (unabhängig

von der Trocknungstemperatur) wird das Futter deutlich besser verwertet als bei Zusatz von Abfallmehlen ($P < 0,01$).

2.6.2. Einfluß der Trocknungstemperatur auf ΔG

Bei der Betrachtung der ΔG -Daten ist weder bei Filetmehlen noch bei Ganzfischmehlen ein Einfluß der Trocknungstemperatur zu erkennen. Nur bei Abfallmehlen tritt dieser Einfluß in Erscheinung. Hier liegt wie beim PER der Bereich der kritischen Trocknungstemperatur bei 70°C . Nach dem t-Test ergaben sich folgende Werte:

Zwischen Abfall	und	Abfall	beträgt der be- rechnete t-Wert	Zufalls- höchstwert
Gt		40°C	1,57	$t_{0,05,10}=2,23$
40°C		70°C	1,20	$t_{0,05,10}=2,23$
70°C		100°C	<u>3,50</u>	$t_{0,01,10}=3,17$

Die Erhöhung der Trocknungstemperatur bei Abfallmehlen von 70°C auf 100°C ist mit einem Defizit in der täglichen Gewichtszunahme (ΔG) von etwa 22 % verbunden ($P < 0,01$).

Außerdem ist zu erwähnen, daß durch die Verfütterung der Filetmehle im Vergleich zu den Ganzfischmehlen kein Gewinn in der täglichen Zunahme erzielt worden ist. Das könnte damit erklärt werden, daß mit der Verfütterung von Ganzfischmehlen die Ratten bereits ihre maximale tägliche Gewichtszunahme erreicht haben und das zusätzliche Angebot der Filetmehle nicht mehr verwerten.

Bei der Verfütterung von Ganzfischmehlen ist jedoch im Vergleich zu den Abfallmehlen eine deutliche Verbesserung der ΔG zu beobachten. Aus der einfachen Varianzanalyse ergab sich

hier ein F-Wert von 21. Dieser Wert ist wesentlich größer als die beiden Grenzwerte:

$$F_{7, 46, 0,05} = 2,22$$

$$F_{7, 46, 0,01} = 3,05$$

Das bedeutet, daß die Ganzfischmehle wesentlich besser durch die Ratten verwertet worden sind als die Abfallmehle ($P < 0,01$).

2.6.3. Einfluß der Trocknungstemperatur auf BW und die Verdaulichkeit

Bei der statistischen Analyse der BW-Werte der Filetmehle ergab der t-Test zwischen "Filet 70° C" und "Filet 100° C" einen Wert von $t = 6,5$. Dieser ist als signifikant zu betrachten ($P < 0,01$), da ein t-Wert von $t_{0,01, 13} = 4,22$ als Zufallshöchstwert erforderlich ist, um einen signifikanten Unterschied zu ergeben. Die Trocknungstemperatur hat bis 70° C keinen schädlichen Einfluß auf die BW hervorgerufen.

Erst bei Trocknungstemperaturen über 70° C wurde der Einfluß der Hitzebehandlung (irreversible Denaturierung) bemerkbar. Ein entsprechender Einfluß ist auch auf die Verdaulichkeit festzustellen.

Beim Ganzfischmehl ergaben die BW-Werte, daß hier der denaturierende Einfluß schon bei 70° C eintritt. Obwohl die Abnahme der BW klein ist, ist sie nach dem t-Test statistisch signifikant ($P < 0,05$):

Zwischen Ganzfisch und Ganzfisch		beträgt der berechnete t-Wert	Zufalls-höchstwert
Gt	40°C	0,99	t0,05,9=2,26
40°C	70°C	2,16	t0,05,9=2,26
70°C	100°C	1,44	t0,05,10=2,23
Gt	70°C	<u>2,89</u>	t0,05,10=2,23
Gt	100°C	<u>2,72</u>	t0,05,10=2,23

Die Trocknungstemperatur von 70° C zeigt gegenüber Gt ein kleines BW-Defizit ($P < 0,05$). Bei 100° C ist eine deutlichere Abnahme zu erkennen, diese ist jedoch nicht mit einer gleichzeitigen Abnahme der "wahren Verdaulichkeit" verbunden.

Aus den BW-Werten der Abfallmehle ergibt sich, daß hier ein negativer Einfluß der Trocknungstemperatur nicht ohne weiteres zu erkennen ist. Es besteht nur ein kleiner signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) zwischen dem "Abfall Gt" und dem "Abfall 100° C". Aus dem t-Test ergeben sich folgende Zahlen:

Zwischen Abfall und Abfall		beträgt der berechnete t-Wert	Zufalls-höchstwert
Gt	40°C	1,45	t0,05,12=2,18
Gt	70°C	2,07	t0,05,11=2,20
Gt	100°C	<u>2,34</u>	t0,05,13=2,16

Hier ist ein Vorteil der Gefriertrocknung als schonendes Trocknungsverfahren zu erkennen.

Der festgestellte negative Einfluß der Trocknungstemperatur auf die BW ist auch hier nicht mit einem parallelen Einfluß auf die Verdaulichkeit verbunden.

Die Feststellung, daß die Verdaulichkeit beim Ganzfisch- und Abfallmehl im Gegensatz zur BW nicht beeinflußt wird, läßt darauf schließen, daß der negative Einfluß der Hitzebehandlung

sich auf biologisch aktive Gruppen des Proteins beschränkt. Beim Filetmehl ist die Einwirkung der Hitzebehandlung stärker und beeinflusst nicht nur die biologisch aktiven Gruppen, sondern auch die Verdaulichkeit des Proteins.

Aus der vergleichenden Analyse der BW-Werte von Filet- und "Ganzfischmehlen" (mit Ausnahme der "100° C"-Mehle) ergab sich ein F-Wert von 3,99.

Dieser Wert ist größer als die Grenzwerte:

$$F_{5, 30, 0,05} = 2,53$$

$$F_{5, 30, 0,01} = 3,70$$

Die vergleichende Analyse der BW-Werte von Ganzfisch- und Abfallmehlen (ohne Abfallmehl "Gt") ergab einen F-Wert von 10,27. Dieser

Wert ist größer als beide Grenzwerte:

$$F_{5, 31, 0,05} = 2,51$$

$$F_{5, 31, 0,01} = 3,66$$

Das besagt, daß im allgemeinen die BW der Filetmehle größer ist als die der Ganzfischmehle und diese wiederum größer ist als die der Abfallmehle ($P < 0,01$)

Schlußfolgerung:

Diese Ergebnisse zeigen, daß eine gewisse Tendenz bei den drei Fischmehlsorten in ihrem Verhalten gegenüber der Hitzebehandlung besteht. Bei der Anwendung von Trocknungstemperaturen über 70° C wurde bei den Filetmehlen sowohl die BW als auch die Verdaulichkeit erheblich beeinträchtigt, bei den Ganzfischmehlen dagegen nur die BW. Bei den Abfallmehlen verschiebt sich die Denaturierung mehr nach 100° C, jedoch ebenfalls ohne Einfluß auf die Verdaulichkeit. Mit anderen Worten: Je hochwertiger das Protein ist, um so empfindlicher ist es gegenüber der Hitzebehandlung.

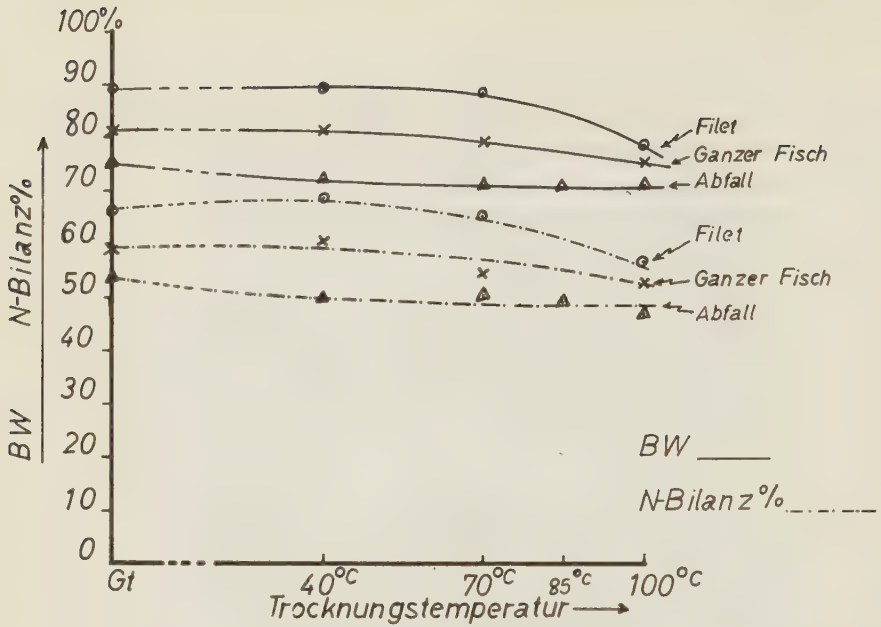


Abb. B3 Einfluß der Trocknungstemperatur auf BW und N-Bilanz%

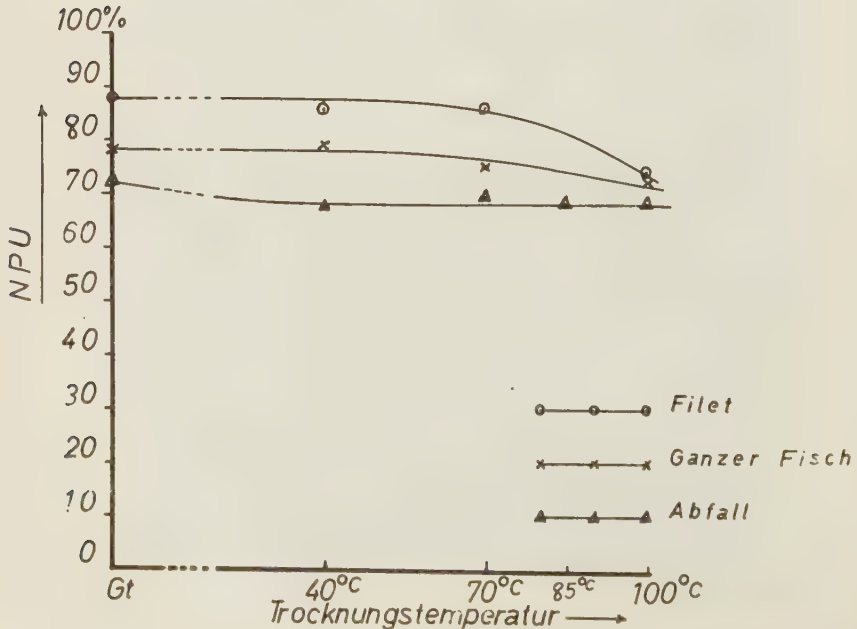


Abb. B4 Einfluß der Trocknungstemperatur auf NPU

Gleiche BW ergaben: "Filet 100° C" und "Ganzfisch Gt", "Ganzfisch 100° C" und "Abfall Gt".

Ob diese gleichen Daten auf Schädigung durch Hitzebehandlung ("Filet 100° C", "Ganzfisch 100° C") oder auf die Herkunft des Proteins ("Ganzfisch Gt", "Abfall Gt") zurückzuführen sind, läßt sich nicht sagen.

2.6.4. Einfluß der Trocknungstemperatur auf die NPU

Aus der zusammenfassenden Tabelle (B 11) ist ersichtlich, daß die NPU-Werte bei allen Fischmehlen in ihrer Größenordnung mit den BW-Werten übereinstimmen. Das war zu erwarten, weil die "wahren Verdaulichkeitskoeffizienten" in jeder Fischmehlsorte, mit Ausnahme der "Filet 100° C", nahezu konstant geblieben sind. Auch hier zeigt sich, daß die kritische Trocknungstemperatur beim "Filet" und "Ganzfisch" zwischen 70° C und 100° C liegt, beim Abfall liegt diese um 100° C. Aus der NPU wurden NPU_m (für Erhaltung) und NPU_g (für Wachstum) ermittelt (vergl. Abb. B 4).

Aus den NPU_m -Werten ergibt sich, daß diese für alle Gruppen und Sorten von Fischmehlen konstant sind:

$$NPU_m = 19,48 \pm 1,74; n = 88; k = 13$$

Bei den untersuchten Fischmehlen ist also (bei gleicher Futteraufnahme) NPU_m konstant und unabhängig von Qualität und Herkunft (Filet, Ganzfisch bzw. Abfall) des Proteins. Das besagt, daß die Tiere diese NPU_m -Menge für ihren Erhaltungsbedarf benötigen. Der Unterschied zwischen einem hochwertigen und einem geringwertigen Fischprotein tritt erst in ihrer NPU_g in Erscheinung.



Abb. B5 NPU, NPU_m und NPU_g in den verschiedenen Fischmehlsorten bei verschiedenen Trocknungstemperaturen.

Der höhere NPU_m -Wert bei der Casein + Methionin Gruppe ($NPU_m = 27,0$) ist auf die unterschiedliche Futteraufnahme der Tiere dieser Gruppe zurückzuführen. Aus unbekanntem Grund haben die mit Casein + Methionin gefütterten Tiere lediglich 4-5 g T.S. pro Tier und Tag zu sich genommen. Das besagt, daß die NPU_m um so kleiner wird, je höher die aufgenommene Protein- bzw. Futtermenge ist. Aus diesem Grunde blieb für die Casein + Methionin Gruppe eine kleinere NPU_g zur Verfügung als für die Abfallmehle, obgleich beide praktisch die gleiche NPU aufweisen.

Aus der Tabelle B 11 ist weiter zu entnehmen, daß die NPU_g und die N-Bilanz %-Werte identisch sind. Die kleinen Unterschiede, die beim "Filet 100° C", "Ganzfisch Gt" und "Abfall 100° C" auftreten, stellen nach dem t-Test keine signifikanten Differenzen dar:

Fischmehl	t-Wert zwischen NPU_g u. N-Bilanz %	Zufalls- höchstwert
Filet 100° C	1,82	$t_{0,05,12} = 2,18$
Ganzfisch Gt	1,50	$t_{0,05,10} = 2,23$
Abfall 100° C	1,87	$t_{0,05,12} = 2,18$
Casein + Meth.	<u>5,66</u>	$t_{0,01,12} = 4,32$

Nur bei der Casein + Methionin Gruppe ist die Differenz zwischen NPU_g und N-Bilanz %, obwohl sie klein ist (3 Werte), statistisch signifikant, ($P < 0,01$).

2.6.5. Einfluß der Trocknungstemperatur auf die

N-Bilanz %

Die N-Bilanz stellt die potentielle N-Menge dar, die das Wachstum des wachsenden Tieres bestimmen kann. Als Maßstab für das Wachstum

bzw. die Gewichtszunahme dienen PER und ΔG . In Abb. B 5 ist der Zusammenhang zwischen N-Bilanz und PER dargestellt, sowie in Abb. B 6 der Zusammenhang zwischen N-Bilanz und ΔG . Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß der Zusammenhang zwischen N-Bilanz und PER enger ist als der zwischen N-Bilanz und ΔG . ($r = + 0,772$ bzw. $r = + 0,569$). Die Streuung der N-Bilanz/PER-Kurve beträgt $\pm 4,51$ und ist damit kleiner als die der N-Bilanz/ ΔG -Kurve, die $\pm 6,28$ beträgt. Dieses Ergebnis stimmt mit den Angaben von C o s t a (1960) überein.

Aus Tabelle B 11 ist zu ersehen, daß bei den Filetmehlen die Erhöhung der Trocknungstemperatur von 70°C auf 100°C eine signifikante Abnahme der N-Bilanz verursacht ($P < 0,001$).

Nach dem t-Test ergibt sich ein Wert von $t = 7,15$. Dieser ist signifikant, da als Zufallshöchstwert $t_{0,001,12} = 4,32$ erforderlich wäre.

Bei Ganzfischmehlen liegt nach der N-Bilanz die kritische Trocknungstemperatur ebenfalls bei 70°C . Zwischen "Ganzfisch 70°C " und "Ganzfisch 100°C " besteht jedoch kein signifikanter Unterschied, wohl aber zwischen "Ganzfisch Gt" und "Ganzfisch 70°C " ($P < 0,05$) bzw. zwischen "Ganzfisch Gt" und "Ganzfisch 100°C " ($P < 0,001$).

Aus dem t-Test ergaben sich folgende Zahlen:

Zwischen Ganzfisch und	Ganzfisch	beträgt der berechnete t-Wert	Zufalls-höchstwert
70°C	100°C	0,68	$t_{0,05,10} = 2,23$
Gt	70°C	<u>2,23</u>	$t_{0,05,10} = 2,23$
Gt	100°C	<u>4,66</u>	$t_{0,001,10} = 4,59$

Diese Ergebnisse stimmen mit den BW-Ergebnissen überein.

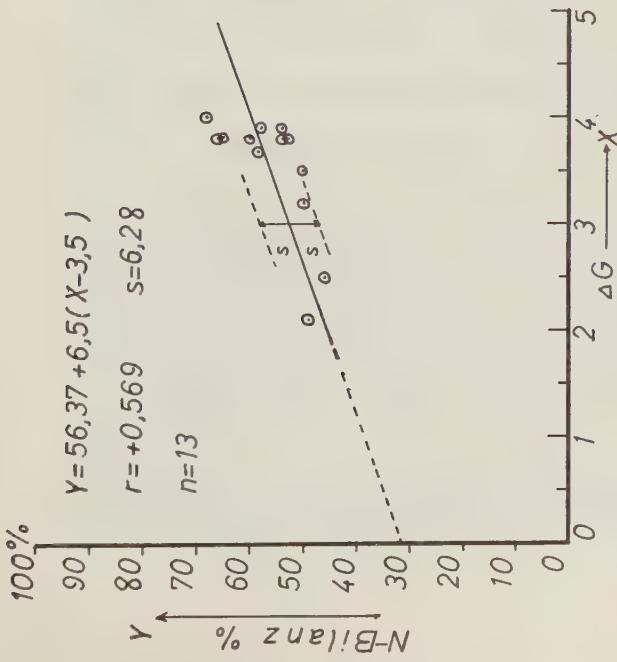


Abb. B6 Der Zusammenhang zwischen NBilanz% und ΔG

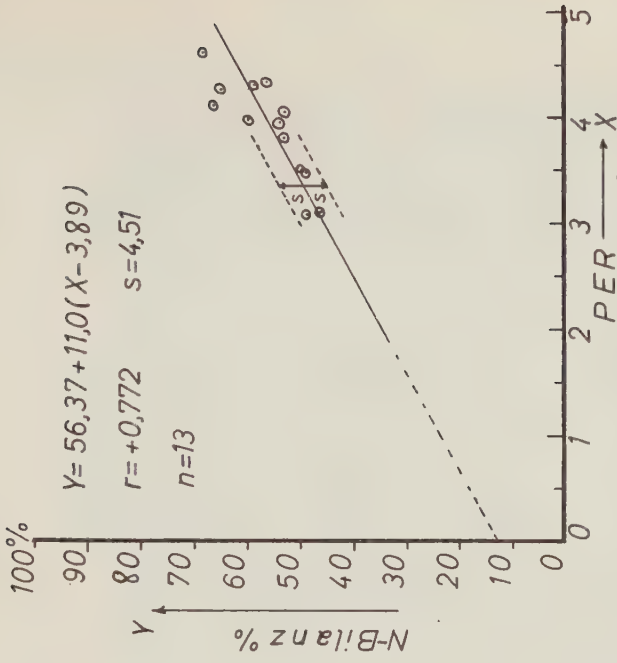


Abb. B7 Der Zusammenhang zwischen NBilanz% und PER

Bei den Abfallmehlen ist anhand der N-Bilanz der Vorteil der Gefriertrocknung deutlicher zu erkennen als bei den BW-Daten. Das bestätigt, daß dieses Trocknungsverfahren schonender ist als alle anderen.

Aus dem t-Test ergaben sich hier folgende Zahlen:

Zwischen Abfall	und	Abfall beträgt der be- rechnete t-Wert	Zufalls- höchstwert
Gt	40°C	2,25	t0,05,12=2,18
Gt	70°C	<u>2,68</u>	t0,05,12=2,18
Gt	100°C	<u>4,82</u>	t0,001,12=4,32
70°C	100°C	<u>3,12</u>	t0,01,12=3,05

Bei den hitzebehandelten Abfallproben liegt also nach der N-Bilanz die kritische Trocknungstemperatur ebenfalls bei 70° C ($P < 0,05$), im Gegensatz zu den BW-Daten (bei 100° C).

Aus der Vergleichsanalyse der N-Bilanz-Werte (Filet Gt, 40° C, 70° C und Ganzfisch Gt, 40° C, 70° C) ergab sich ein F-Wert von 11,8. Dieser berechnete Wert ist wesentlich größer als beide Grenzwerte:

$$F_{5, 33, 0,05} = 2,50$$

$$F_{5, 33, 0,01} = 3,63$$

Die Variabilität zwischen den Gruppen "Filet" und "Ganzfisch" ist also größer als diejenige innerhalb der einzelnen Gruppe und kann daher nicht durch Zufallseinflüsse erklärt werden ($P < 0,01$). Dasselbe Ergebnis hat sich aus der Analyse der N-Bilanz -Werte (Ganzfisch Gt, 40° C, 70° C und Abfall Gt, 40° C, 70° C) ergeben. Der berechnete F-Wert beträgt auch 11,8 und ist ebenfalls größer als beide Grenzwerte:

$$F_{5, 31, 0,05} = 2,52$$

$$F_{5, 31, 0,01} = 3,68$$

Das besagt, daß die N-Bilanz %-Werte der "Filetmehle" (außer Filet 100° C) größer sind als der "Ganzfischmehle" und diese (ebenfalls außer Ganzfisch 100° C) wiederum größer sind als die der "Abfallmehle" ($P < 0,01$). Diese Ergebnisse stimmen mit den BW-Daten überein. Es besteht also eine gewisse Übereinstimmung der N-Bilanz % Daten mit den BW-Daten. Sie haben aber stets einen verhältnismäßig größeren Variationskoeffizienten.

Weiterhin zeigen sowohl die N-Bilanz %-Daten als auch die BW-Daten einen klaren Unterschied zwischen den drei Fischmehlssorten aus "Filet", "Ganzfisch" und "Abfall", solange es sich nicht um hitzegeschädigte Mehle handelt. Z. B. sind beim "Filet 100° C" und "Ganzfisch Gt" oder "Ganzfisch 100° C" und "Abfall Gt" die N-Bilanz-Werte sowie die BW-Werte nicht in der Lage auszusagen, ob der niedrige Wert auf die Herkunft des Materials oder auf den Einfluß der Trocknungstemperatur zurückzuführen sind.

2.7. Diskussion der biologischen Bewertungsmaßstäbe

Für die biologische Bewertung ist es erforderlich, die Aussagen mehrere Methoden gegenüberzustellen. Der biologische Wert eines Proteins ist nämlich bedingt sowohl durch seine Verdaulichkeit (wV ; sW), als auch durch seine Fähigkeit das Wachstum zu fördern (ΔG ; NPU_g ; N-Bilanz %), seine Fähigkeit den Erhaltungsbedarf zu decken (NPU_m) und seine Verwertung durch den Körper, z. B. seine Futtermittelverwertungszahl (PER) und seine biologische Wertigkeit (BW).

Der Einfluß der Herkunft des Proteins (Filet, Ganzfisch und Abfall) und die Einwirkung von

Trocknungsart und -temperatur auf die Qualitätsveränderung wurde anhand oben genannter biologischer Bewertungsmaßstäbe (Fütterungsversuche) untersucht.

Über die Aussagekraft der einzelnen Bewertungsmethoden können auf Grund der eigenen Untersuchungen folgende Schlüsse gezogen werden:

- 1) Die "BW" ist eine kombinierte Methode, die auf der Bestimmung der N-Bilanz und der endogenen N-Ausscheidung basiert. Sie stellt einen Maßstab für Erhaltung und Wachstum dar, während die N-Bilanz nur ein Maßstab für den potentiellen N-Anteil ist, der das Wachstum (beim wachsenden Tier) bestimmen kann. Erwartungsgemäß sind die BW-Werte stets höher als die N-Bilanz-Werte.

Die BW-Daten haben im allgemeinen die N-Bilanz %-Daten bestätigt. Bei den Filet- und Ganzfischmehlen liegt der Bereich der kritischen Trocknungstemperatur (nach den BW- und N-Bilanz-Daten) um 70° C. Nur beim Abfallmehl wurde keine volle Übereinstimmung zwischen beiden Methoden erzielt, da hier nach der N-Bilanz die kritische Temperatur um 70° C liegt und nach der BW um 100° C. Nach den erzielten NPU_g-Daten besteht jedoch zwischen dem "Abfall 70° C" und "Abfall 100° C" kein signifikanter Unterschied. Zwischen dem sogen. "Fischmehl X" (bei etwa 90° C getrocknetes Mehl) und dem "Abfall 70° C" wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied in den N-Bilanz %-Daten festgestellt. Danach ist es wahrscheinlicher, daß der Bereich der kritischen Trocknungstemperatur bei den Abfallmehlen um 100° C liegt.

2) Die wahre Verdaulichkeit (wV) bzw. die NPU-Daten ergänzen die Kenntnis über die Art des Einflusses der Trocknungstemperaturen auf das untersuchte Protein. Durch Gegenüberstellung der wV und der BW können folgende Aussagen gemacht werden:

- a) Die Trocknungstemperatur kann die BW negativ beeinflussen (wie z. B. bei Ganzfisch- und Abfallmehlen). Das läßt darauf schließen, daß der negative Einfluß der Hitzebehandlung sich nur auf biologisch aktive Gruppen des Proteins - wie SH-Gruppen, E-Aminogruppen usw - beschränkt.
- b) Der Einfluß der Trocknungstemperatur kann sich jedoch auch sowohl auf die BW als auf die wV erstrecken. Durch die Hitzedenaturierung können damit sowohl einige der biologisch aktiven Gruppen geschädigt, als auch u. a. die Löslichkeit und damit auch die Verdaulichkeit herabgesetzt worden sein (wie z. B. bei Filetmehlen).
- c) Dieser unterschiedliche Einfluß der Hitzebehandlung ist danach abhängig von der Art bzw. Zusammensetzung des untersuchten Proteins (Filet, Ganzfisch bzw. Abfall).

3) Durch die "NPU" kann der Wachstumsbedarf "NPU_g" bzw. der Erhaltungsbedarf "NPU_m" des Versuchstieres aus dem untersuchten Protein ermittelt werden. Über die Aussagekraft jedes dieser Bewertungsmaßstäbe kann folgendes festgestellt werden:

- a) Die NPU_g-Daten bestätigen die N-Bilanz %-Daten, d. h. beide sind miteinander identisch. Dadurch wird bestätigt, daß mit Hilfe der kombinierten "Thomas-Mitchell-

Methode" (BW) der Wachstumsbedarf eines Tieres bestimmt werden kann.

- b) Die Ermittlung der NPU_m ergänzt die Kenntnisse über das Schicksal des vom Tier aufgenommenen Proteins, da nur damit Aussagen über den Erhaltungsbedarf eines Tieres gemacht werden können. Sie ist bei gleicher Futteraufnahme konstant und unabhängig von der Qualität des Proteins.

Bei gleicher NPU und unterschiedlicher Futteraufnahme kann die NPU_m außerdem als Maßstab für die Qualität des untersuchten Proteins dienen. Je kleiner die NPU_m z. B. ist, um so größer ist der biologische Wert des untersuchten Proteins. Demzufolge steigt die restliche Proteinmenge (NPU_g), die das schnellere Wachstum des Tieres bestimmen kann.

Bei unterschiedlicher Futteraufnahme empfiehlt es sich, andere Maßstäbe wie PER, NPU_g bzw. N-Bilanz % zu berücksichtigen (vgl. Casein + Methionin Gruppe).

- 4) Die N-Bilanz % ist ein Maßstab für die N-Menge, die das Wachstum des Tieres bestimmen kann. PER und ΔG sind Bewertungsmaßstäbe, die auf der Gewichtszunahme des Tieres basieren. Bei Gegenüberstellung dieser Daten konnte folgendes festgestellt werden:

- a) Die PER-Daten stimmen mit den N-Bilanz-Daten besser überein als die ΔG -Daten. Das ist eine Bestätigung dafür, daß die PER zur Überprüfung des Einflusses, den das untersuchte Protein auf das Wachstum des Tieres ausübt, besser geeignet ist als die ΔG -Daten (Vergleich Abb. B 5 mit Abb. B 6).

2.8. Zusammenfassung der Ergebnisse der biologischen Bewertung

Mit Hilfe der in dieser Arbeit benutzten Bewertungsmaßstäbe, insbesondere mit der BW (Thomas-Mitchell-Methode) konnten sowohl die Qualitätsunterschiede zwischen den untersuchten Fischmehlen (Filet, Ganzfisch, Abfall) als auch der Einfluß steigender Trocknungstemperaturen (Gt, 40° C, 70° C, 100° C) auf die Qualität nachgewiesen werden.

Bei der Überprüfung der Qualitätsbeeinflussung durch die Trocknung konnte festgestellt werden, daß die Proteine gegen Temperatureinflüsse umso anfälliger werden, je hochwertiger sie sind. Bei Filet- und Ganzfischmehlen lag z. B. die kritische Trocknungstemperatur bei 70° C, bei Abfallmehl um 100° C. Bei Filetmehlen wird dabei sowohl die BW als auch die Verdaulichkeit herabgesetzt, bei den Ganzfisch- und Abfallmehlen nur die BW.

Die Qualitätsunterschiede zwischen den drei Fischmehlen waren nach den Ergebnissen der biologischen Bewertung allerdings nur dann deutlich, solange diese nicht höher erhitzt waren (unter 70° C).

Bei den höher erhitzten Proben (ab 70° C) konnte nur zwischen den bei gleicher Trocknungstemperatur behandelten Proben unterschieden werden. Das gilt jedoch nicht für unterschiedlich behandelte Mehle. Z. B. weist das gefriergetrocknete Ganzfischmehl den gleichen biologischen Wert auf wie das bei 100° C getrocknete Filetmehl.

Wenn ein Fischmehl "in vivo" einen niedrigen biologischen Wert aufweist kann dieser also sowohl durch unsachgemäße Verarbeitung (zu hohe Trocknungstemperatur) verursacht worden sein als auch

durch höhere Anteile von Abfallproteinen (Köpfe, Gräten usw.).

Durch die biologische Bewertung kann also die absolute Qualität eines Proteins für die Ernährung festgestellt werden.

Es ist allerdings nicht möglich, mit Hilfe der biologischen Bewertung allein etwas über die Ursachen eines verminderten biologischen Wertes auszusagen. Es soll im folgenden unter anderem versucht werden, ob mit Hilfe chemischer Methoden in dieser Hinsicht ergänzende Aussagen möglich sind.

C Die chemische Bewertung =====

des Proteins =====

1. Theoretischer Teil

Weder in der Praxis noch bei wissenschaftlichen Untersuchungen wird die Bestimmung des Rohproteins allein, wie früher üblich, für ausreichend befunden, etwas über die Qualität eines proteinhaltigen Futter- bzw. Lebensmittels auszusagen.

Zuerst wurde versucht, mit Hilfe chemisch-enzymatischer Methoden - in vitro - etwas über die Verdaulichkeit der Proteine auszusagen. Das führte schließlich zur sogenannten "Pepsin-Salzsäure-Methode", die verschiedentlich modifiziert wurde. Z.B. existieren unterschiedliche Auffassungen über die geeignetste Säure- oder Enzymkonzentration, ob die Bestimmung besser über das Rest-N oder das gelöste-N, über die freien Amino- oder Carboxylgruppen erfolgen sollte.

Die Bestimmung der Verdaulichkeit "in vitro" ermöglicht zwar eine erweiterte Aussage über eine Eigenschaft des Proteinanteils des Futter- bzw. Nahrungsmittels, der Gehalt oder die Verdaulichkeit bestimmen aber nicht allein den Wert eines Proteins. Die ernährungswissenschaftliche Forschung hat erkannt, daß die Zusammensetzung eines Proteins, insbesondere der Aminosäuren, letzten Endes seinen Wert ausmacht. Vor allem gilt das für die essentiellen Aminosäuren, auf deren Zufuhr der tierische bzw. menschliche Organismus unbedingt angewiesen ist, weil er sie nicht selbst synthetisieren kann. Aus dieser Erkenntnis heraus wurde versucht, mit Hilfe der Bestimmung einzelner charakteristischer Aminosäuren laboratoriumsmäßig etwas über den Ernährungswert von Proteinen auszusagen. Dieser Weg hätte noch den Vorteil, daß er schneller zu Ergebnissen führt, als es mit biologischen Methoden möglich wäre.

1.1. Bestimmung des verdaulichen Rohproteins in vitro (Der Pepsin-HCl-Wert)

Die Bestimmung der Verdaulichkeit ist bei den meisten Nährstoffen nur über den Tierversuch (in vivo) möglich. Für die Bestimmung der Verdaulichkeit der Proteine wurde durch die Pepsin-Salzsäure-Methode nach S t u t z e r ein einfach durchführbares Verfahren entwickelt, um den verdaulichen Anteil an N-haltigen Stoffen zu erfassen. Die zu untersuchende Substanz wird dazu bei Körpertemperatur (37°C) 48 Stunden lang der Einwirkung des Enzyms (verwendet wurde Pepsin-Präparat Nr. 7180, DAB 6, "Merck") unterworfen, wobei durch Zusatz von Salzsäure das Reaktionsmilieu den Verhältnissen im Magen angeglichen wird. Dabei wird der verdauliche Anteil der Proteinsubstanzen in Lösung gebracht. Aus dem N-Gehalt im ungelösten Rückstand wird die Menge an unverdaulichem Rohprotein berechnet. Die Differenz aus dem Gesamtprotein und dem unverdaulichen Rohprotein ergibt den Gehalt an "unverdaulichem Rohprotein".

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode für die Bestimmung der Verdaulichkeit (in vitro) herangezogen. [Vergl. Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik - "Methodenbuch" - Bd. III: Die Untersuchung von Futtermitteln; S. 22 (1951)].

Neuerdings haben A m b r o s e und S n y d e r (1964), L o v e r n et al. (1964) und D r e o s t i et al. (1964) empfohlen, daß die bisherige offizielle Methode der Pepsin-Salzsäure-Verdaulichkeit-Bestimmung unbedingt modifiziert werden müßte, um sie zu einer für die Praxis wirklich brauchbaren Methode zu entwickeln, da sie nicht immer zuverlässige Ergebnisse liefert. Wenn die Pepsin-Salzsäure-Werte niedrig

sind, dann stimmen sie mit der "in vivo" bestimmten Verdaulichkeit gut überein; wenn sie aber hoch sind, dann sei dieses nicht immer der Fall. Die genannten Autoren weisen auf die Notwendigkeit eines Blindwertes (Salzsäure ohne Enzyme) für die Berechnung der Pepsin-Werte hin und führen den Begriff "korrigierter Pepsin-Wert" ein; jeder empfiehlt dabei allerdings einen anderen Weg, um diesen "korrigierten Pepsin-Wert" zu ermitteln.

D r e o s t i et al. (1964) benutzen folgende Formel:

$$\begin{aligned} &\text{korrigierter Pepsin-Wert} = \\ &\text{Pepsin-HCl-Wert abzüglich Blindwert.} \end{aligned}$$

L o v e r n et al. (1964) hingegen empfehlen folgende Formel:

$$\begin{aligned} &\text{korrigierter Pepsin-Wert} = \\ &\frac{\text{Pepsin} \cdot \text{HCl-Wert} - \text{Blindwert}}{100 - \text{Blindwert}} \cdot 100 \end{aligned}$$

Die Summe (100 - Blindwert) stellt die säureunlösliche Proteinmenge dar. Es hat sich nach L o v e r n (1965) jedoch gezeigt, daß dieser Blindwert keineswegs konstant ist, sondern daß er mit steigender Dauer der Säureeinwirkung zunimmt. Das bedeutet, daß eine absolute Trennung zwischen dem ursprünglich säurelöslichen Protein und dem durch die Säure löslich gewordenen Protein nicht möglich ist.

Auch die Art des untersuchten Proteins spielt eine nicht unwesentliche Rolle. Fischfilets z.B. bestehen vorwiegend aus unlöslichem Muskelprotein, nur in verdorbenen oder unsachgemäß behandelten Filets nimmt der Anteil an löslichem Protein zu. Das Fischabfall-Protein hingegen enthält neben unlöslichem Muskelprotein einen größeren Anteil lösliches Eiweiß (Fischsoluble). Wenn eine solche Pro-

teinprobe der Pepsin-Salzsäure-Behandlung unterworfen wird, wird dabei die durch das Vorhandensein der Säure aktivierte Löslichkeit des Proteins, die also nicht durch die eigentliche Pepsinwirkung zustande kam, mitgemessen.

K o v a l ' c h u c k (1954) hat aufgezeigt, daß die Hitzebehandlung eines Fischproteins zu einer unterschiedlichen Pepsinwirkung auf die löslichen und die unlöslichen Proteinanteile führt. Der Pepsin-Spaltungsgrad des löslichen Proteinanteils wird dabei stärker vermindert, als der des unlöslichen Proteinanteils. Aus diesem Grunde komme bei der Pepsin-Salzsäure-Methode der wahre Einfluß der Pepsinwirkung auf das betreffende Protein nicht voll zum Ausdruck.

Auch der Qualitätszustand des Proteins spielt für den Verlauf der Bestimmung eine wichtige Rolle. Nach L o v e r n (1965) hat die Pepsin-Salzsäure-Wirkung auf ein gutes Fischmehl ihr Maximum bereits nach etwa 8 Stunden erreicht, während für eine entsprechende Wirkung bei schlechten Fischmehlen bis zu 40 Stunden benötigt werden. In der Praxis ist allerdings vor der Untersuchung nicht ohne weiteres zu erkennen, ob ein gutes, weniger gutes oder verdorbenes Fischmehl vorliegt.

In Abänderung der bisher üblichen Methodik sollte nach K o v a l ' c h u c k (1954) als Maßstab für die Pepsinverdaulichkeit die Zunahme der freien Aminogruppen bewertet werden. Nach L o v e r n (1965) käme auch eine Bestimmung der Zunahme der freien Carboxylgruppen in Frage. Diese neuen Wege sind allerdings noch nicht genügend erforscht.

1.2. Bestimmung von essentiellen Aminosäuren zur Bewertung von Proteinen

Seit langem wird versucht, auch für die Praxis geeignete Methoden zu entwickeln, um die zeitrau-

benden und aufwendigen Tierversuche durch chemische Analysen zu ersetzen oder zu ergänzen. Das ist in der Vitaminforschung bereits gelungen, jedoch sind in der Proteinforschung die Ergebnisse bisher noch nicht voll befriedigend. Es wurde von vielen Autoren versucht, den Gehalt an essentiellen Aminosäuren mit dem biologischen Wert des Proteins in Beziehung zu bringen. Die meisten dieser Methoden setzen den Gehalt an essentiellen Aminosäuren eines geprüften Proteins in Beziehung zum Gehalt an essentiellen Aminosäuren eines sogenannten "idealen Proteins", bevor sie die Daten mit der B.I. vergleichen. B l o c k and M i t c h e l l (1946), O s c a r (1951) und M i t c h e l l (1952) nehmen z.B. das Eiprotein; K ü h n a u (1949) die Muttermilch und N e h r i n g (1952) die Kuhmilch als Bezugsgröße.

Die bekanntesten Methoden sind folgende:

- 1.) Der "Chemical score" nach B l o c k und M i t c h e l l (1946) sah den Gehalt an limitierenden essentiellen Aminosäuren im untersuchten Protein in Beziehung zum Gehalt im Eiprotein.
- 2.) Die "Wertigkeit" nach K ü h n a u (1949) setzt als Bezugsgröße die Muttermilch ein. Sie bezieht sich auf das Verhältnis der Summe der essentiellen Aminosäuren Cystin und Tyrosin im Protein zur Muttermilch. Er unterscheidet eine Gesamtwertigkeit, eine Reinwertigkeit und eine Ergänzungswertigkeit.
- 3.) Die "biologische Wertigkeit" nach N e h r i n g (1952) verwendet entsprechend die Kuhmilch als Bezugsgröße (vergl. K ü h n a u).
- 4.) Der "essentielle Aminosäure-Index" (EAS-Index) nach O s e r (1951) legte für die Berechnung die 10 essentiellen Aminosäuren zu Grunde.

Er ist folgendermaßen zu ermitteln:

$$= \sqrt[10]{\frac{1a}{1b} \cdot 100 + \frac{2a}{2b} \cdot 100 + \frac{3a}{3b} \cdot 100 + \dots + \frac{10a}{10b} \cdot 100}$$

1a, 2a, --- = Gehalt an essentiellen Aminosäuren im Protein x

1b, 2b, --- = Gehalt an essentiellen Aminosäuren im Eiprotein.

- 5.) Nach dem "EAS-Index" nach M i t c h e l l (1952) wird das Argenin nicht mehr als essentielle Aminosäure betrachtet. Das "EAS-Index" ist daher als 9. Wurzel aus den übrigen 9 essentiellen Aminosäuren zu ermitteln.
- 6.) Nach der "Eck-Aminosäuren-Theorie" nach K o f r a n y i (1956) ist es für die chemisch-analytische Bestimmung der biologischen Wertigkeit nicht erforderlich, alle Aminosäuren eines Nahrungsmittelproteins zu bestimmen. Es reicht die genaue Erfassung derjenigen essentiellen Aminosäure aus, die nach dem Minimumgesetz den begrenzenden Faktor bildet. Da immer die gleichen Aminosäuren, vor allem Lysin, ferner Methionin, Tryptophan und Threonin als Begrenzung der biologischen Wertigkeit auftreten, werden sie als "Eck-Aminosäuren" bezeichnet.

Im Falle des Fischproteins kommt in dieser Hinsicht z.B. das Tryptophan in Frage. Im Prinzip weicht die "Eck-Aminosäure-Theorie" nicht wesentlich von der "chemical score" Theorie ab. K o f r a n y i bringt lediglich den Gehalt an limitierenden, essentiellen Aminosäuren direkt in Beziehung zur BW.

Wie L e a and H a n n a n (1950) und H e n r y and K o n (1950) aufgezeigt haben, ist nicht das gesamte Lysin für den Nährwert eines Proteins von Bedeutung, sondern nur das sogenannte "verfügbare Lysin". Unter dem verfügbaren Lysin

wird der Anteil des Gesamtgehaltes an Lysin verstanden, dessen ϵ -Aminogruppe ungebunden frei vorliegt.

C a r p e n t e r und E l l i n g e r (1955), C a r p e n t e r et al. (1957), O s t e r h a u t et al. (1959) und C a r p e n t e r (1960) haben festgestellt, daß zwischen dem Gesamtgehalt an Lysin und dem biologischen Wert eines Proteins "gross protein value" (G.P.V.) kein Zusammenhang besteht, wohl aber zwischen dem Gehalt an "verfügbarem Lysin" und dem biologischen Wert (Kükenversuch).

Um den biologischen Wert des Fischproteins auf chemischem Weg zu ermitteln, wurde in der vorliegenden Arbeit der Gehalt an den beiden Aminosäuren Tryptophan und "verfügbarem Lysin" bestimmt, um die Ergebnisse der chemischen Analyse mit den biologischen Bewertungsmaßstäben (Rattenversuche) zu vergleichen.

1.2.1. Bestimmung des Tryptophans

Die Schwierigkeit bei der chemischen Bestimmung des Tryptophans liegt in seiner Säureempfindlichkeit. Es läßt sich also nicht, wie bei den meisten anderen Aminosäuren üblich, durch die bequemere Säurehydrolyse freisetzen und im gleichen Hydrolysat neben anderen Aminosäuren bestimmen.

Unter geeigneten Bedingungen jedoch läßt es sich mit Hilfe der alkalischen Hydrolyse chemisch recht gut erfassen. Es existieren eine Reihe von Methoden, die zur Bestimmung des Tryptophans vorgeschlagen werden. Alle diese Methoden beruhen auf der Reaktion des Tryptophans mit Aldehyden, die nach anschließender Oxydation zur Ausbildung eines blauen Farbstoffes führt. Die Verknüpfung der Aldehydgruppe mit dem Tryptophan erfolgt dabei wahrscheinlich nicht an der Aminogruppe, da andere Aminosäuren (wie Glycin, Asparaginsäure

und Tyrosin) diese Reaktion nicht zeigen.

Im folgenden sind einige der in der Literatur -
Verf. hierzu auch S p i e s - C h a m b e r s
(1948) - vorgeschlagenen Aldehyde zusammengestellt:

- Glyoxylsäure : A d a m k i e w i e z (1874),
H o p k i n s (1901),
W i n k l e r (1934),
Brieskorn und Berg (1959).
Formaldehyd : V o i s e n t (1905),
R ö s e n h e i m (1906).
Benzaldehyd : R e i c h e l (1889),
S o l e (1904), F e a r o n (1920).
Salicylaldehyd: R e i c h e l (1890),
V o i s e n t (1905),
F e a r o n (1920).
p-Dimethyl- : R h o d e (1905), Herzfeld
aminobenz-
aldehyd (p-DAB) (1913), M a y and Rose (1922),
S p i e s and C h a m b e r s
(1948), H a r r i s o n and
H o f m a n n (1961),
H o f r a n y i (1964).

Von diesen Aldehyden haben sich besonders die
Glyoxylsäure und der p-DAB bewährt s. H a u r o -
w i t z (1963). Aus diesem Grunde wurde bei den
eigenen Untersuchungen mit folgenden zwei Metho-
den gearbeitet, die sich dieser Aldehyde bedienen.

- 1.) Die Glyoxylsäure-Methode nach W i n k l e r
in der Modifikation nach A n t o n a c o -
p o u l o s . Die Modifikation beruht darauf,
daß einmal die Bestimmung nicht nach Ausfäll-
lung des Proteins mit Trichloressigsäure er-
folgt, sondern nach alkalischer Hydrolyse,
zum anderen wurden die Konzentrationen der Re-
agentien z.T. unwesentlich geändert und da-
durch der Arbeitsgang vereinfacht.

2.) Die p-DAB-Methode nach Spies-Chambers. Es wurde mit einer 19n Säure gearbeitet, da diese Konzentration für die Bestimmung in proteinhaltigen Substanzen geeignet ist. Außerdem kann unter diesen Bedingungen die Reaktionsdauer verkürzt werden.

1.2.2. Bestimmung des "verfügbaren Lysins":

Mit Hilfe der Methode von Carpenter (1960) wird nur der Teil des Lysins erfaßt, dessen ϵ -Aminogruppe frei vorliegt. Dieser wird als "verfügbares Lysin" bezeichnet.

Zuerst wird dabei das zu untersuchende Protein der sogenannten "Sanger-Reaktion" unterworfen. Sanger hat 1945 erstmalig das Flurodinitrobenzol (FDNB) zur R-NH₂ Endgruppenbestimmung vorgeschlagen. Dieses FDNB reagiert auch mit den freien ϵ -Aminogruppen des Lysins, schützt dieses einmal bei der folgenden sauren Hydrolyse vor weiterem Angriff und bildet zum anderen einen gelben Farbstoff, der sich kolorimetrisch auswerten läßt. Das freie Lysin wird dabei nicht miterfaßt, weil das Di-(α , ϵ)-DNP-Lysin im Gegensatz zum ϵ -DNP-Lysin ätherlöslich ist. Aus diesem Grund erfolgt die Reaktion mit dem FDNB vor der Hydrolyse. Normalerweise kommt das Lysin in Nahrungsmitteln nicht in freier Form vor, höchstens infolge autolytischer Vorgänge. Dann erübrigt sich jedoch die Bestimmung des "verfügbaren Lysins", weil dann das Nahrungsmittel für den Genuß ungeeignet ist. (Eine Ausnahme bildet das durch Fischsilage oder dergleichen fermentative Vorgänge verarbeitete Futter).

Das Prinzip der Bestimmung des "verfügbaren Lysins" beruht darauf, daß aliquote Teile der Hydrolysate mit Äther ausgeschüttelt werden, wobei die ätherlöslichen von den in Äther unlöslichen DNP-Aminosäuren getrennt werden. (Zu den ätherlöslichen

DNP-Aminosäuren zählt z.B. auch das nicht nutzbare α -DNP-Lysin).

Die in der verbliebenen wässrigen Lösung kolorimetrisch zu messende Absorption wird als A-Wert bezeichnet.

Durch Behandlung mit Methoxycarbonylchlorid (Methylchloroformiat), auch Bailey-Reaktion genannt, wird das ϵ -DNP-Lysin ätherlöslich. Es kann dann durch nochmaliges Ausschütteln entfernt werden. Die in der wässrigen Lösung verbliebene meist schwache Gelbfärbung wird als B-Wert vom A-Wert in Abzug gebracht:

$$\epsilon\text{-DNP-Lysin} = \text{A-Wert} - \text{B-Wert}.$$

C a r p e n t e r stellte 1960 fest, daß während der Hydrolyse 9 % des ϵ -DNP-Lysins zersetzt werden, aus diesem Grund wird der erhaltene Wert mit dem Faktor 1,09 korrigiert.

1.3. Die nicht-essentiellen Aminosäuren

Bisher war es nicht üblich, im Rahmen der Qualitätsbeurteilung des Fischproteins auch nicht essentielle Aminosäuren zu bestimmen.

Auf Grund der Vorschläge von Antonacopoulos (1957) für die chemische Bestimmung des Bindegewebes kann eine genaue Aussage über die Zusammensetzung von Fleischzubereitungen gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Methoden auf das Fischprotein übertragen (s.a. Möhler und Antonacopoulos (1957)).

1.3.1. Bestimmung des Glycins:

Die Aminosäure Glycin stellt die einfachste Form aller Aminosäuren (Aminoessigsäure) dar. Aus diesem Grunde erwies sich eine quantitative Bestimmung des Glycins als besonders schwierig, da fast alle Reaktionen des Glycins durch andere

Aminosäuren gestört werden. Es ist bekannt, daß die Aminosäuren bei der Einwirkung von Ninhydrin, in den um ein C-Atom äromeren Aldehyd, NH_3 und CO_2 zerfallen. Bei Glycin ist dabei Formaldehyd zu erwarten. Erst 1945 konnte Mac Payden dies bestätigen. 1949 hat Krüger versucht, diese Reaktion zu einer qualitativen und quantitativen Methode der Glycinbestimmung zu entwickeln. Antonacopoulos hat 1957 diese Methode vereinfacht und sie dadurch zu einer für die Praxis brauchbaren quantitativen Methode ausgearbeitet.

Bei dieser Bestimmungsmethode besteht die Gefahr, daß andere Aminosäuren in die Reaktion hineingezogen werden können. Diese Möglichkeit wird durch Anwendung von Aktivkohle ausgeschaltet, wobei besonders die störenden, aromatischen Aminosäuren entfernt werden. Bei genauer Einhaltung bestimmter Versuchsbedingungen, z.B. Menge der Aktivkohle und Dauer ihrer Einwirkung, werden mögliche Schwankungen bei der Bestimmung weitgehend ausgeschaltet. Der nach Behandlung mit Ninhydrin gebildete Formaldehyd wird in einer besonderen Apparatur im statu nascendi quantitativ abdestilliert und im Destillat mit Hilfe der Chromotropsäure bestimmt (Reaktion nach "Brenan"). Die Extinktion der entstehenden Färbung wird in einem Spektralphotometer (z.B. Beckman DB) bei Wellenlänge 578 m μ oder in einem beliebigen Photometer mit Filter (z.B. Eppendorf, Filter Hg 578) in 5 mm Küvetten gemessen und anhand einer Eichkurve auf Glycin berechnet.

1.3.2. Bestimmung des Hydroxyprolins:

Für die Hydroxyprolinbestimmung wurde die Methode nach Neumann - Logan (1950) bzw. Wierbicka und Deatherage (1954),

ebenfalls in der Modifikation von Antonacopoulos (1957) herangezogen. Die Methode beruht auf der Oxydation des Hydroxyprolins mit alkalischem Wasserstoff in Gegenwart von Kupfersulfat zu einem Produkt, das mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (p-DAB) in saurem Medium in der Hitze eine rote Färbung gibt.

Die Extinktion der entstehenden Färbung wird bei $565\text{ m}\mu$ in einem Spektralphotometer oder Filter-Photometer (wie Glycin) gemessen unter Verwendung von 10 mm Küvetten und berechnet anhand einer Eichkurve.

1.4. Die Hydrolyse

Bevor die Bestimmung des Gehaltes an Aminosäuren in Nahrungs- bzw. Futtermitteln auf chemisch-analytischem Weg erfolgen kann, ist eine vorherige Hydrolyse erforderlich, um die Aminosäuren aus dem Proteinverband zu spalten. Die Hydrolyse kann mit Hilfe von Säuren, Basen oder Enzymen erfolgen. Wichtig für eine einwandfreie Hydrolyse ist jedoch, daß die Spaltung der Proteine in die Aminosäuren vollständig verläuft und dabei keine Veränderungen bzw. Zerstörung der Aminosäuren eintreten.

Über die Eignung der enzymatischen Hydrolyse herrscht in der Literatur keine Übereinstimmung. Z.B. kritisierte N e h r i n g (1959) dieses Verfahren und bezeichnete es als zu langwierig, es käme dabei zu keiner Endspaltung der Proteine zu Aminosäuren. Im Gegensatz dazu sind u.a. H a u r o w i t z (1963) und C r e m e r (1965) der Meinung, daß durch die enzymatische Hydrolyse doch gute Ergebnisse zu erzielen sind.

1.4.1. Die saure Hydrolyse:

Im allgemeinen wird die saure Hydrolyse folgender Vorteile wegen gewählt:

- 1.) Durch die saure Hydrolyse wird eine Racemisierung der Aminosäuren vermieden, d.h. die Aminosäuren werden in ihrer unveränderten Form erhalten.
- 2.) Die Aminosäuren sind mit Ausnahme des Tryptophan, den schwefelhaltigen Aminosäuren und den Hydroxyaminosäuren der sauren Hydrolyse gegenüber stabil. (Mit Hilfe von Perameisensäure können allerdings z.B. Cystin und Cystein in eine oxydierte, gegen Säure stabile Form überführt werden. Die Zerstörung der Hydroxyaminosäuren findet nur sehr langsam statt, der ursprüngliche Gehalt an Serin und Threonin z.B. kann deshalb durch Extrapolieren ermittelt werden) [H a u r o w i t z (1963)] .
- 3.) Die saure Hydrolyse greift die Gefäße nicht so stark an wie die alkalische.

Bei den eigenen Untersuchungen wurde die saure Hydrolyse nach A n t o n a c o p o u l o s (1957) für die Bestimmung des Glycins und des Hydroxyprolins angewandt:

1 g Substanz + 15 ml HCl (2:1) + SnCl_2

Die Menge des zugesetzten SnCl_2 soll etwa 75 v.H. des RP-Gehaltes der Substanz betragen. SnCl_2 wirkt wegen seiner reduzierenden Eigenschaften oxydationshemmend und damit der Huminbildung entgegen.

Die Normalhydrolyse am Rückflußkühler oder Steigrohr wird wegen ihrer einfachen Durchführbarkeit in der Praxis bevorzugt. Die Druckhydrolyse dagegen wird seltener und nur für Sonderfälle vorgeschlagen, z.B. für die Glutaminsäurebestimmung. [H a u r o w i t z (1963)] Über den allgemeinen Gebrauch der Druckhydrolyse bei der Bestimmung von Aminosäuren herrscht in der

Literatur keine Übereinstimmung. Nehring und Schröder (1959) sprechen sich z.B. für die Druckhydrolyse aus, während Heintze (1955) bei der Druckhydrolyse eine Zerstörung einzelner Aminosäuren feststellen konnte. Nach Heintze (1955) zählt das Glycin zu den wenig empfindlichen Aminosäuren, auch bei höheren Temperaturen unter Druck soll keine wesentliche Schädigung eintreten.

1.4.2. Die alkalische Hydrolyse:

Obwohl bei der alkalischen Hydrolyse die Aminosäuren racemisiert werden, ist sie im Falle des säureempfindlichen Tryptophans angezeigt. Über ihre günstigsten Bedingungen herrscht aber in der Literatur keine Übereinstimmung. Für die Durchführung der alkalischen Hydrolyse sind folgende Gesichtspunkte von Bedeutung:

- 1.) Art und Stärke des verwendeten Alkalis.
Vorgeschlagen werden: NaOH 1n bis 5n
daneben $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 5 n bis 6 n
(Höller (1958)).
- 2.) Temperatur und Zeitdauer der Hydrolyse:
Dieser Faktor richtet sich nach der Art der Hydrolyse, d.h. unter Druck oder am Rückflußkühler, und nach der Art und Stärke des verwendeten Alkalis.
- 3.) Verwendung von oxydationshemmenden Zusätzen
(wie SnCl_2 , TiCl_3) oder nicht.

Bei den eigenen Untersuchungen wurde für die Bestimmung des Tryptophans die alkalische Hydrolyse, ebenfalls nach Antonacopoulos (1963), durchgeführt:

1g Substanz + 20 ml 2 n NaOH + SnCl_2 .

2. Experimentieller Teil

2.1. Der Pepsin-Salzsäure Wert

Bei den eigenen Untersuchungen wurde für die Bestimmung des verdaulichen Rohproteins in vitro die Methode nach S t u t z e n (Methoden-Buch, Band 3, S. 22) herangezogen. Demnach erfolgte die Durchführung der Bestimmung folgendermaßen:

- 1.) 2 g Fischmehl + 1 g Pepsin + 480 ml H₂O + 10 ml 25 %ige HCl werden im Wasserbad unter kontinuierlichem Umrühren der Lösung 24 Stunden bei 37° bis 40° C gehalten. Darauf werden weitere 10 ml 25 %ige HCl zugesetzt, um einen pH-Wert von etwa 2 einzustellen. Nach weiteren 24 Std. wird abfiltriert.
- 2.) Die Rückstände (mit Filter) werden nach K j e l d a h l aufgeschlossen und von dem Gesamt-N-Gehalt in Abzug gebracht.

Verwendet wurde das Pepsin-Präparat (DAB 6 Kr. 7180 von Merck).

2.1.1. Einfluß der Trocknungstemperatur auf den Pepsin-Salzsäure-Wert:

Aus den Tabellen A 12 (vgl. unter A 2.4.) und C 1 sowie Abb. C 1 ist ersichtlich, daß die gewählten Trocknungstemperaturen keinen Einfluß auf den Gesamt-Rohproteingehalt der drei Fischmehlsorten haben, dagegen nimmt der Anteil an verdaulichem Rohprotein mit zunehmender Trocknungstemperatur ab. Beim Abfall ist dieser Einfluß am geringsten, beim ganzen Fisch ist die Abnahme etwas deutlicher, sie beträgt bei 100° C etwa 2 %, am stärksten tritt dieser Einfluß beim Filetmehl mit 4 % bei 100° C in Erscheinung. Das deutet darauf hin, daß der Einfluß der Trocknungstemperatur auf den Anteil an verdaulichem

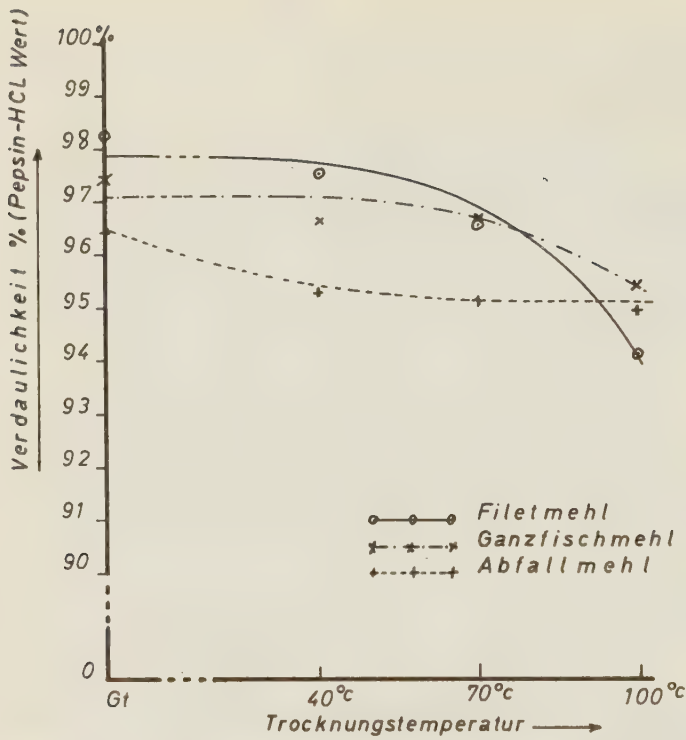


Abb. C1 Einfluß der Trocknungstemperatur auf die Verdaulichkeit "in vitro".

Rohprotein von der Art des Proteins abhängig ist. Je hochwertiger das Protein ist, desto empfindlicher reagiert es auf Temperatur-Einflüsse.

Tabelle C 1

Gehalt an verdaulichem Rohprotein in den untersuchten Fischmehlen bei verschiedenen Trocknungstemperaturen in %.

Fischmehl aus	Trocknungstemperatur			
	Gt	40°C	70°C	100°C
Filet	98,24	97,45	96,50	94,10
Ganzer Fisch	97,34	96,60	96,60	95,40
Abfälle	96,40	95,30	95,10	94,90

Gt = Gefriergetrocknet

2.2. Bestimmung des Tryptophans

Das Tryptophan wurde, wie bereits angegeben, nach folgenden zwei Methoden bestimmt:

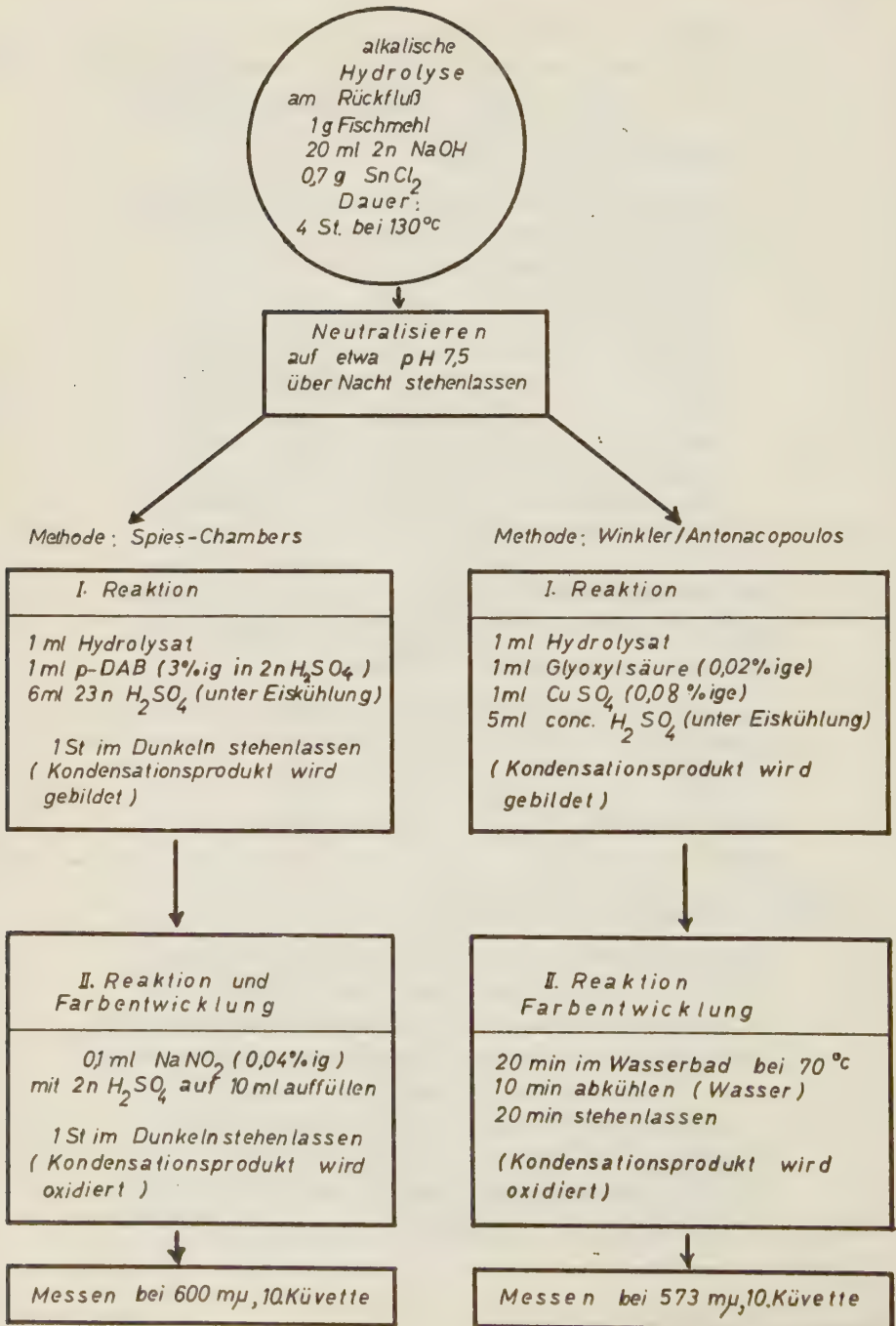
1. nach S p i e s - C h a m b e r s (1949)
2. nach W i n k l e r / A n t o n a c o p o u l o s (1963)

Einen Überblick über die beiden Methoden gibt Abb. C 2.

2.2.1. Herstellung der Eichkurven:

Zur Herstellung der Eichkurven werden genau 20 mg dl Tryptophan eingewogen, in etwa 12 ml 1n NaOH gelöst und in einem Meßkolben auf 200 ml aufgefüllt. Von dieser Stammlösung werden jeweils 5, 10, 20, 25, 30, 40 und 50 ml (Bürette) mit aqu.dest. auf 50 ml aufgefüllt. Diese Lösungen enthalten 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 und 100 µg dl Tryptophan pro ml. Aus diesen Standard-Lösungen werden die Bestimmungen nach beiden Methoden

Abb. C2 schematische Darstellung der Tryptophanbestimmung



vorgenommen. In Abb. C 3 und C 4 sind die resultierenden Eichkurven nach den Methoden S p i e s - C h a m b e r s bzw. W i n k l e r / A n t o n a c o p o u l o s dargestellt.

Maxima der Absorptionskurven:

In den Abb. C 5 und C 6 sind die Absorptionskurven der Methode S p i e s - C h a m b e r s bzw. der Methode W i n k l e r / A n t o n a c o p o u l o s dargestellt, woraus die jeweiligen Maxima (600 bzw. 573 m μ) abgelesen werden können.

2.2.2. Die Hydrolyse des Tryptophans:

Hydrolysedauer:

Wie aus Tabelle C 2 zu ersehen, ist eine 4-stündige Hydrolyse bei 130° C mit 2 n NaOH für beide Methoden ausreichend. Diese Zeit sollte jedoch nicht überschritten werden, da bei steigender Dauer der Hydrolyse Tryptophan-Verluste festzustellen sind. Bei der Methode nach W i n k l e r / A n t o n a c o p o u l o s liegen diese nach 7-stündiger Hydrolyse z.B. zwischen 2 und 4 %, bei der Methode nach S p i e s - C h a m b e r s um etwa 9 %. Um die Dauer der Hydrolyse festzulegen, wurde eine beliebige Probe (in diesem Fall Ganzfisch 70° C) verwendet. Auf die Ursachen der unterschiedlichen Werte nach den beiden Methoden wird in den Ausführungen "Überprüfung der beiden Methoden" im Anschluß näher eingegangen.

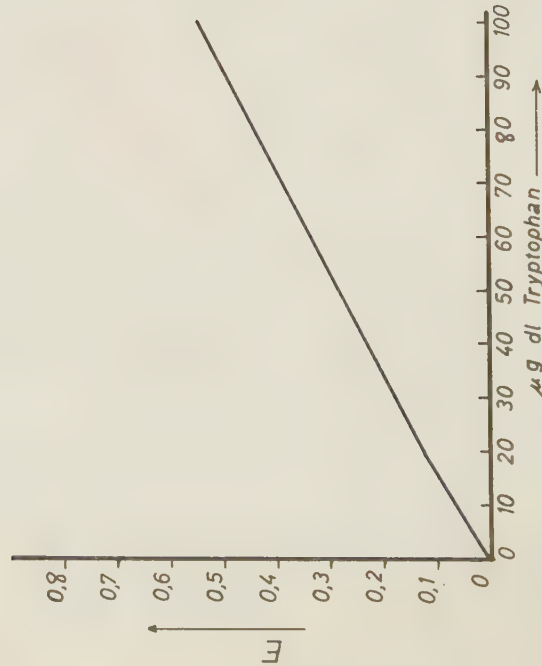


Abb. C3 Tryptophan-Eichkurve

Methode: Spies-Chambers

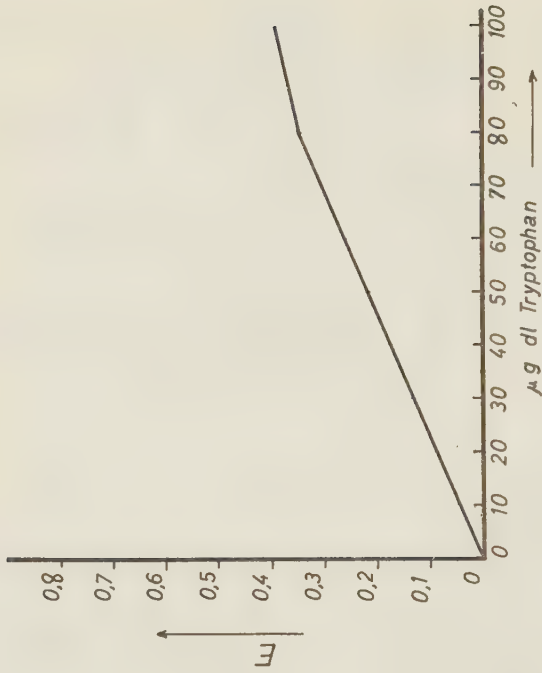


Abb. C4 Tryptophan-Eichkurve

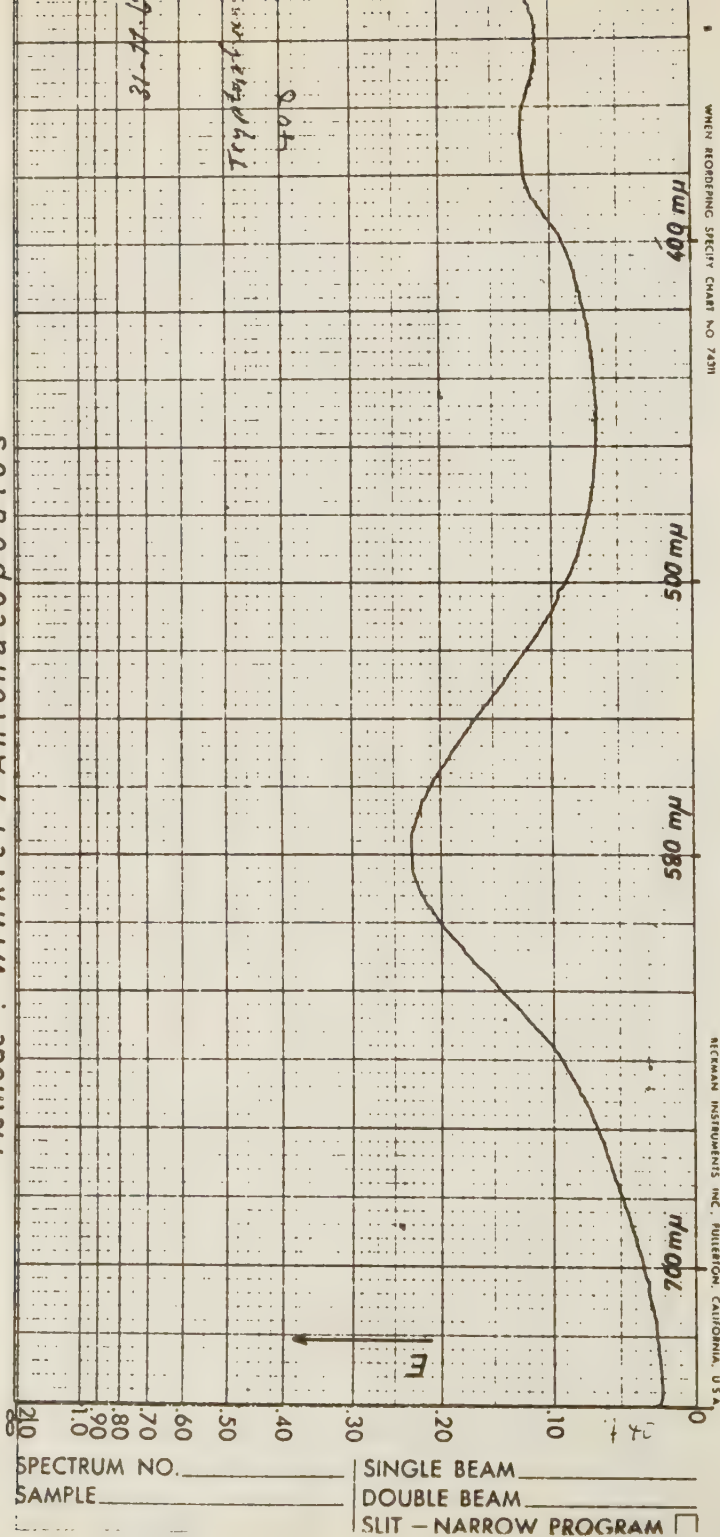
Methode: Winkler /Antonacopoulos

Abb. C5 Absorptionskurve des Tryptophans (100 $\mu\text{g/ml}$)
Methode: Spies - Chambers



Abb. C6 Absorptionskurve des Tryptophans ($40\mu\text{g/ml}$)

Methode : Winkler / Antonacopoulos



Tab. C 2: Einfluß der Hydrolysedauer auf den
Gehalt an Tryptophan

Nr.	Dauer der Hydrolyse St.	Spies-Chambers	Winkler/Antona		
19	3	0,934	0,95	1,41	1,43
20		0,971		1,45	
8	4	1,028	1,02	1,427	1,43
9		1,029		1,429	
1	5	1,039	1,02	1,45	1,42
3		1,012		1,39	
4	6	0,922	0,92	1,380	1,38
5		0,919		1,390	
10	7	0,939	0,93	1,41	1,39
11		0,948		1,39	

Einfluß der Hydrolyse:

Um den Einfluß der Hydrolyse nachzuprüfen erfolgten bestimmte Zusätze einer eingestellten Tryptophanlösung (10 mg/100 ml) bei der Hydrolyse des Fischmehls, und zwar sowohl vor als auch nach der Hydrolyse. Aus der Tabelle C 3 ist zu ersehen, daß die alkalische Hydrolyse keinen schädigenden Einfluß auf das Tryptophan ausübt.

Dieses Ergebnis stimmt mit den Angaben folgender Autoren überein: Albanese und Frankston (1942), Stockes (1945), Massien (1949), Neilands (1949), Lahiry (1955), Rupe und Farmer (1955), Duggan und Udenfried (1956) und Winter (1957).

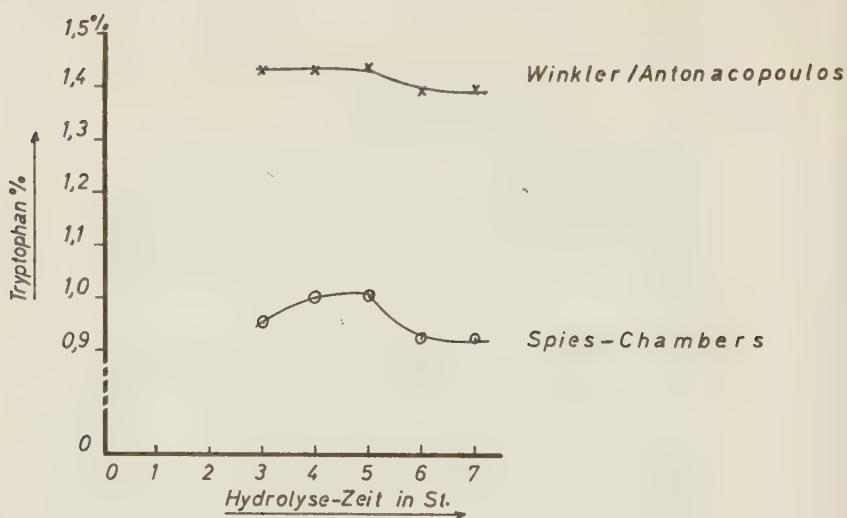


Abb. C7 Einfluß der Hydrolyse-Dauer
auf den Gehalt an Tryptophan

Dagegen haben folgende Autoren einen Verlust an Tryptophan durch die alkalische Hydrolyse feststellen können: Woolley und Schell (1945), Greenhut (1946), Kuiken (1947), Prescott (1949), Spies und Chambers (1949), Miller und Ruttinger (1950), Bruggemann (1952), Portner und Högel (1953), Dreze und Höller (1958).

Die von den Autoren gewählten Hydrolyse-Bedingungen sind z.T. sehr unterschiedlich, das gilt auch für die Methoden der Tryptophan-Bestimmung. Diese Literaturangaben für und gegen die Hydrolyse sind kaum miteinander zu vergleichen, da sie nicht von einer einheitlichen Basis ausgehen

2.2.3. Überprüfung der beiden Bestimmungs-Methoden

Die zwei genannten Methoden wurden (wie bei der Hydrolyse) durch steigende Zugaben der eingestellten Tryptophanlösung (100 mg/100 ml) überprüft. Ein Zusatz von 10 ml entspricht dabei einer Zugabe von 1 mg dl Tryptophan.

Die Zugabe konnte nach der Hydrolyse erfolgen, da durch die alkalische Hydrolyse kein Einfluß festzustellen war. Es wurde weiter überprüft, ob die Art des untersuchten Fischmehls die Ergebnisse beeinflussen kann. Die Ergebnisse dieser Überprüfung sind in Tabelle C 3 wiedergegeben.

Bei der Überprüfung der "Spies - Chambers - Methode" zeigte sich, daß der Fehler bzw. die Abweichung von der Kontrolle (Probe ohne Zugabe) umso größer ist, je höher die zugegebene Tryptophanmenge ist und zwar bei allen

Tabelle C 3 - Einfluß der Hydrolyse auf die Reproduzierbarkeit
der beiden angewandten Methoden für die Bestimmung
des Tryptophans.

		nach Spies-Chambers				nach Winkler/Antonacopoulos							
No	Probe	Zugabe	mg	%	Kontrolle Tryptophan		Theor. Wert %	ge- funden %	Diff. %	Kontrolle Tryptophan %	Theor. Wert %	Gefunden %	Diff. %
					No	%							
13	Vor der Hydrolyse		2	0,2690	8	1,027)	1,2975	1,2629	- 2,6	1,427)	1,6977	1,7864	+ 5,2
14	" "		2	0,2753	9	1,029)	1,3038	1,2703	- 2,6	1,429)	1,7040	1,8094	+ 6,2
15	Nach der Hydrolyse		2	0,2719			1,3004	1,2571	- 3,3		1,7006	1,8121	+ 6,5
16	" "		2	0,2739			1,3024	1,2763	- 2,0		1,7026	1,7563	+ 3,2
37	Vor der Hydrolyse		2	0,2484	65	1,149)	1,3906	1,3857	- 0,35	1,643)	1,8784	1,9517	+ 3,9
38	" "		2	0,2472	66	1,135)	1,3894	1,3881	- 0,10	1,616)	1,8772	1,9597	+ 4,3
39	Nach der Hydrolyse		2	0,2484			1,3906	1,3857	- 0,35		1,8784	1,9517	+ 3,9
40	" "		2	0,2496			1,3918	1,3565	- 2,5		1,8796	1,8983	+ 1,0

Fischmehlsorten (Filet, Ganzfisch und Abfall).

Dagegen weisen die mit der Methode nach W i n k l e r / A n t o n a c o p o u l o s erhaltenen Werte keine Abhängigkeit von der zugegebenen Tryptophan-Konzentration auf.

Aus der Tabelle C 4 geht außerdem hervor, daß die Methode W i n k l e r / A n t o n a - c o p o u l o s weniger durch die Proteinart beeinflusst wird als die Methode nach S p i e s - C h a m b e r s.

Nach der Methode "Winkler / Antonacopoulos" sind außerdem die Unterschiede im Gehalt an Tryptophan zwischen dem Protein des Filets und dem Protein des ganzen Fisches besser erkennbar als nach der Methode "Spies - Chambers". Dies bestätigt und ergänzt die genannten Ergebnisse (Tabelle C 4). Das deutet auf keinen konstanten Verlauf der Farbreaktion bei der letzten Methode hin. Diese Mängel wurden bei der Methode "Winkler" in ihrer Modifikation nach "Antonacopoulos" nicht festgestellt. Daß diese Methode besser reproduzierbare Ergebnisse liefert, wurde auch rechnerisch bewiesen, vergleiche hierzu Tabelle C 5.

Tabelle C 4 - Überprüfung der Reproduzierbarkeit beider Methoden
durch steigende Zugabe von Tryptophan.

No	Probe in mg	Zugabe in %	nach Spies - Chambers				nach Winkler / Antonacopoulos						
			Kontrolle		Theor. Wert %	gefunden %	Diff. %	Kontrolle Tryptophan %	Theor. Wert %	gefunden %	Diff. %		
			No	Tryptophan %									
39	2	0,2434	35	1,149	1,3900	1,3857	-0,35	1,6430	1,8784	1,9517	+3,9	+1,9	
40	2	0,2496	36	1,135	1,3918	1,3565	-2,5	1,6160	1,8796	1,8983	+1,0		
33	4	0,4997			1,6419	1,6150	-1,6		2,1297	2,1757	+2,2	+2,2	
34	4	0,4987			1,6409	1,5900	-3,6		2,1287	2,1828	+2,5		
15	ganzer Hirsch 700 C	2	0,2719	8	1,027	1,3004	1,2571	-3,3	1,427	1,7006	1,8121	+6	+4,5
16		2	0,2759	9	1,029	1,3024	1,2762	-2	1,429	1,7026	1,7563	+3	
41		4	0,5432			1,5717	1,4076	-10		1,9719	2,0097	+2	+1,3
59		4	0,5435			1,5720	1,4627	-7		1,9722	1,9796	+0,5	
61	Abfall 700 C	2	0,2940	49	0,8076	1,0987	1,0406	-5	1,1841	1,4969	1,4998	+0,2	+0,2
62		2	0,2905	50	0,8019	1,0952	1,0491	-4	1,2217	1,4934	1,4957	+0,16	
63		4	0,5800			1,5847	1,1940	-13		1,7829	1,7993	+1,00	+0,6
64		4	0,5764			1,5811	1,2281	-10		1,7793	1,7814	+0,10	

Tab. C 5: Vergleich der Tryptophan-Bestimmungs-
Methoden

	gefunden in	Theoretischer Wert	im Ganz- fisch	Diff. %
Filet:				
Winkler/	1,65	1,65 . 0,42 = 0,694		
Antona- copoulos	Abfall: 1,20	1,20 . 0,58 = 0,696		
		1,390	1,40	1 %
Filet:				
Spies-	1,09	1,09 . 0,42 = 0,460		
Chambers	Abfall: 0,78	0,78 . 0,58 = 0,450		
		0,910	0,98	7,5 %

(Die Angaben sind bezogen auf den bei der Verarbeitung des Kabeljaus erhaltenen Filetanteil von etwa 42 % bzw. Abfallanteil von etwa 58 %).

2.2.4. Einfluß der Trocknungstemperatur auf den Gehalt an Tryptophan

Aus Tabelle C 6 ist zu ersehen, daß das Tryptophan gegen die Hitzebehandlung sehr stabil ist. In keiner der drei Fischmehlsorten (Filet, Ganzfisch und Abfall) ist eine Abnahme des Tryptophangehaltes durch die Trocknungstemperatur bis 100° C festzustellen, weder nach der Methode "Spies - Chambers" noch nach der Methode "Winkler / Antonacopoulos".

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von
K o n o s u u n d M a t s u u r a (1961)

Tabelle C 6 - Der Gehalt an Tryptophan in den verschiedenen
Fischmehlen bei verschiedenen Trocknungs-
temperaturen

Fischmehl	No	Spies-Chambers		Winkler/Antonacopoulos	
Filet Gt	27	1,10	1,08	1,68	1,68
	28	1,04		1,68	
Filet 40° C	29	0,99	0,99	1,66	1,67
	30	0,98		1,68	
Filet 70° C	35	1,15	1,14	1,64	1,63
	36	1,14		1,62	
Filet 100° C	43	1,12	1,14	1,68	1,63
	44	1,16		1,58	
ganzer Fisch Gt	21	0,99	0,99	1,45	1,40
	22	0,98		1,36	
ganzer Fisch 40° C	23	0,97	0,97	1,39	1,38
	24	0,96		1,38	
ganzer Fisch 70° C	8	1,02	1,02	1,43	1,43
	9	1,02		1,43	
ganzer Fisch 100° C	25	0,92	0,95	1,41	1,42
	26	0,96		1,43	
Abfall Gt	45	0,75	0,77	1,15	1,16
	46	0,78		1,17	
Abfall 40° C	47	0,77	0,76	1,16	1,14
	48	0,75		1,13	
Abfall 70° C	49	0,80	0,80	1,18	1,20
	50	0,80		1,22	
Abfall 100° C	51	0,80	0,80	1,24	1,24
	52	0,81		1,25	
Fischmehl X	53	0,74	0,73	1,04	1,03
	54	0,73		1,02	

überein, die weder im getrockneten Fleisch noch in Fleischkonserven eine Schädigung des Tryptophans festgestellt haben. Nach Untersuchungen von A n t o n a c o p o u l o s (1963) bleibt das Tryptophan auch in hocherhitzten Fischmehlen (bis 180° C) noch stabil.

Obwohl das Tryptophan im Fischprotein eine seiner limitierenden Aminosäuren darstellt [M i t c h e l l (1952)], kann es auf Grund dieser Ergebnisse wegen seiner Hitzestabilität nicht als allgemein gültiger wertbestimmender Maßstab für die Qualität herangezogen werden.

2.3. Bestimmung des "verfügbaren Lysins"

Das "verfügbare Lysin" wurde nach der Methode von C a r p e n t e r (1960) bestimmt. Der Arbeitsgang bei der Bestimmung ist in Abb. C 8 schematisch wiedergegeben.

2.3.1. Herstellung der Eichkurve

Maxima der Absorptionskurve: Für die Herstellung der Absorptionskurve und der Eichkurve wurde ϵ -DNP-Lysinchlorid verwendet, das nach Empfehlung von C a r p e n t e r direkt in England bezogen wurde. Das war erforderlich, da die direkte, quantitative Umsetzung von dl Lysinchlorid mit FDNP auf Schwierigkeiten stößt.

Die Absorptionskurve des DNP-Lysinchlorid wurde in einem Spektralphotometer (Beckman DB) im Bereich von 720 - 320 m μ aufgenommen. Ihr Hauptmaximum (s. Abb. C 9) liegt zwischen 364 - 366 m μ , ein weiteres bei 265 m μ . Die gleichen Maxima hat S a n g e r (1949) festgestellt.

Abb. C 8 Schematische Darstellung der Bestimmung des verfügbaren Lysins

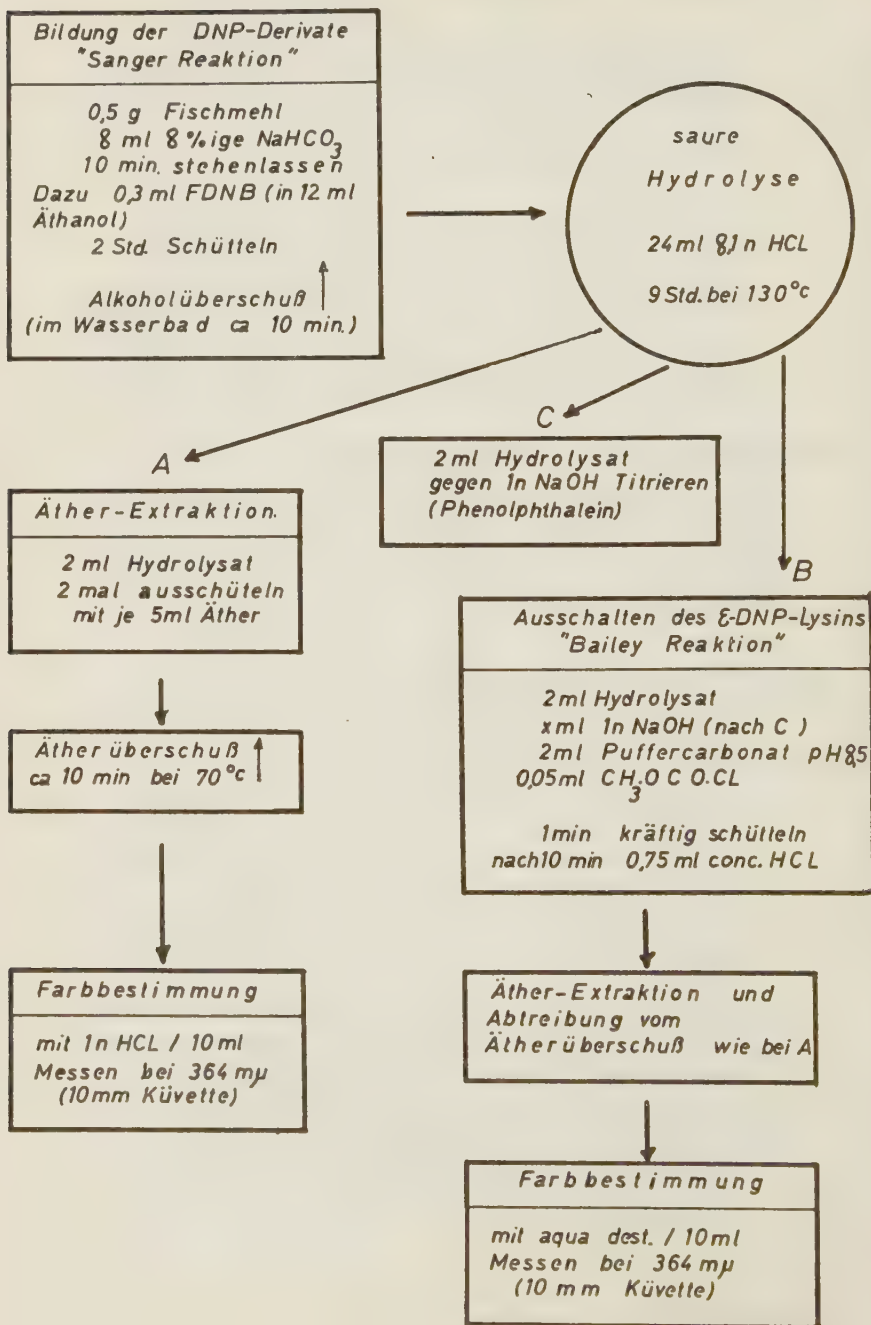


Abb. C9 Absorptionskurve des ϵ -DNP-Lysin-HCl ($40 \mu\text{g/ml}$)
Methode : Sanger-Carpenter

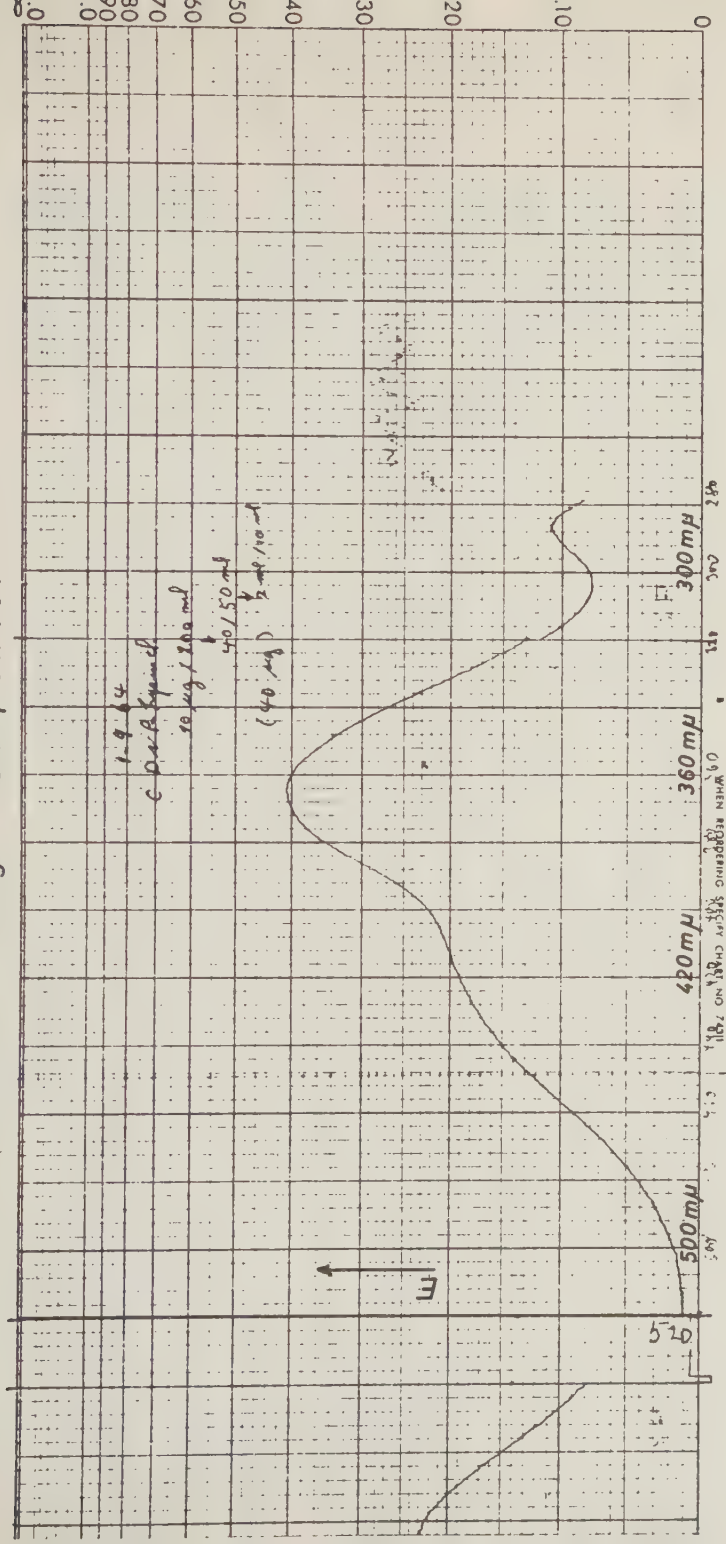


Abb. C10² Absorptionskurve des "verfügbaren Lysins" (A-Werte)

Methode : Carpenter

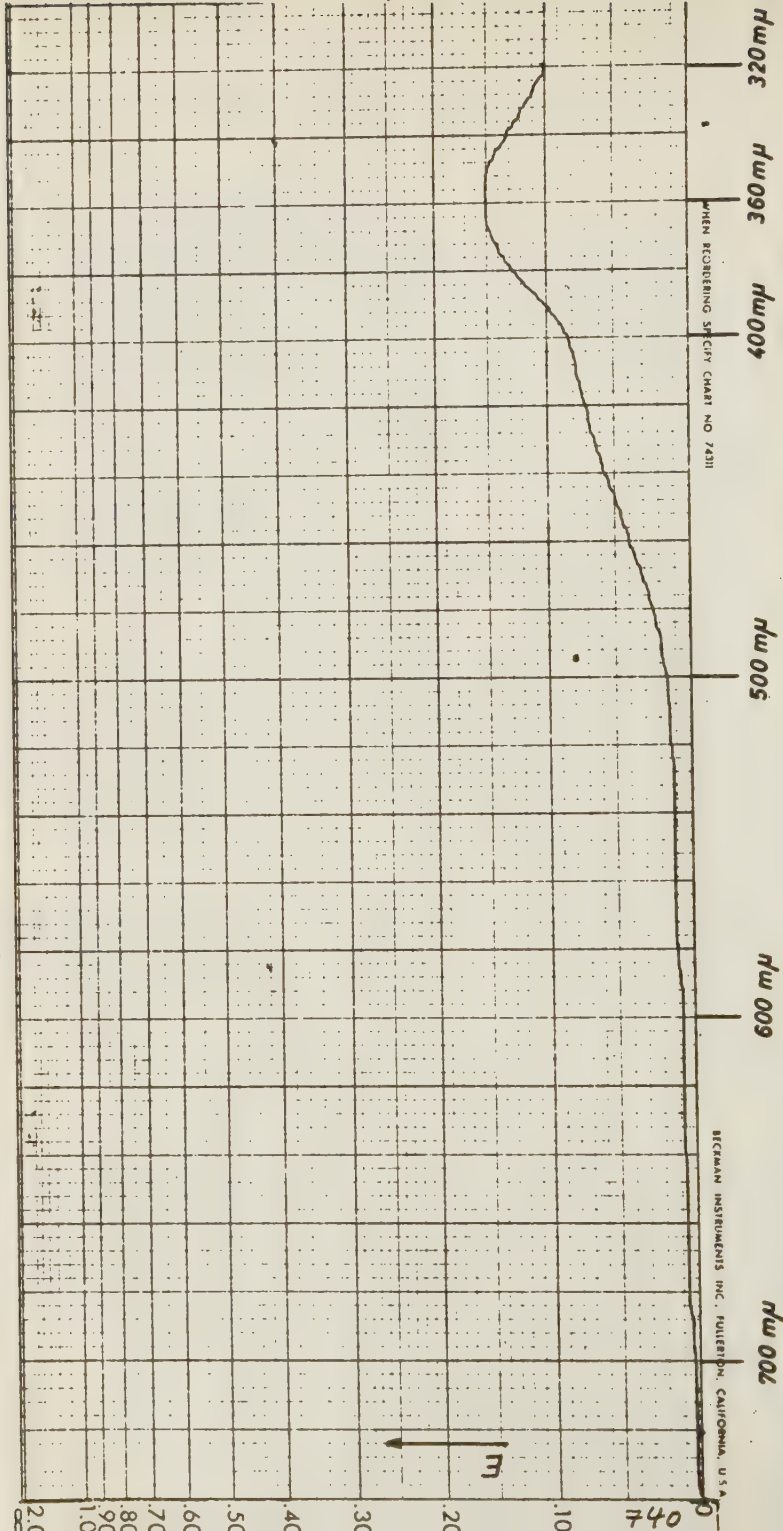
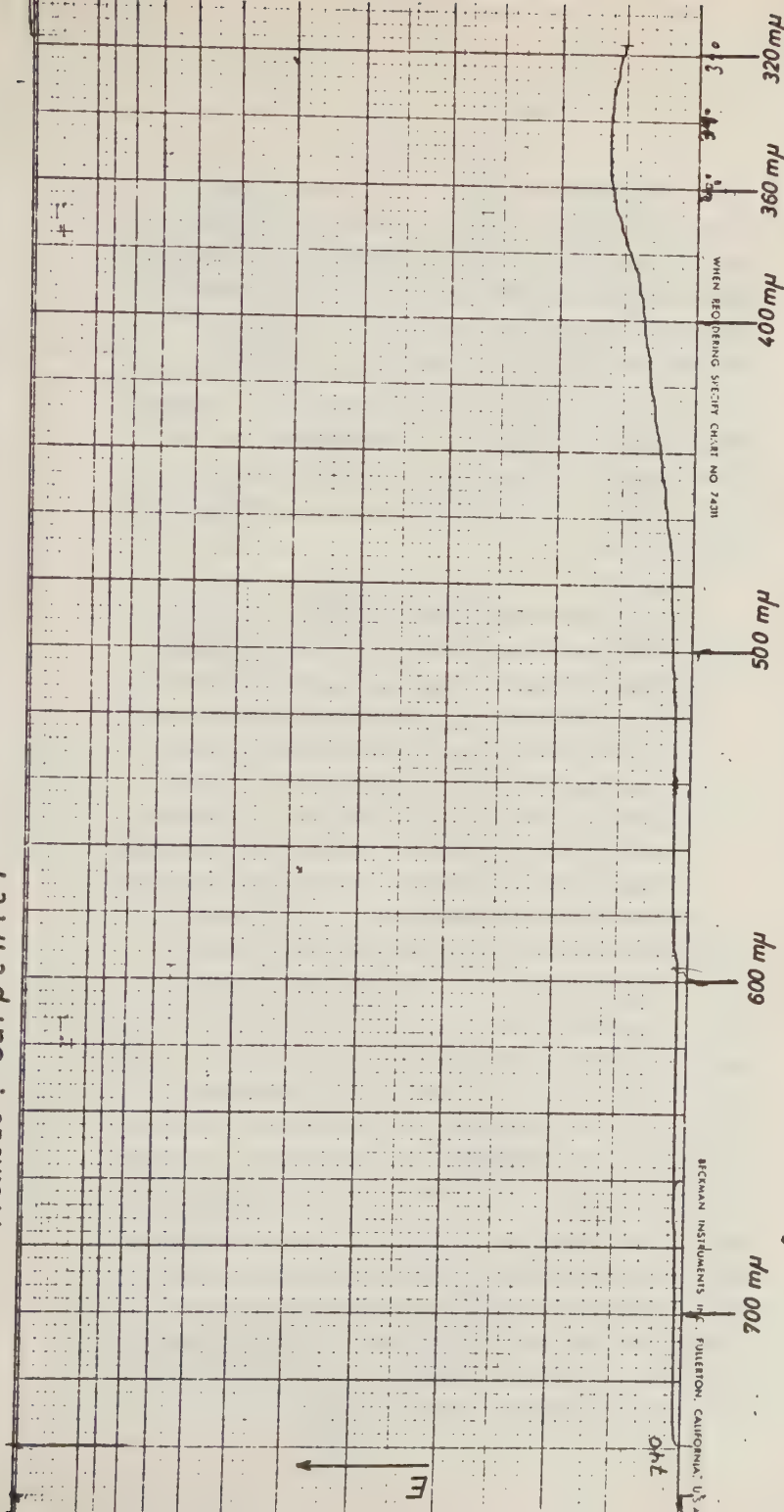


Abb. C11^{*} Absorptionskurve des "verfügbaren Lysins" (B-Werte)
Methode: Carpenter



^{*} (Abb. C10/11 aufgenommen aus einem Fischmehl-Hydrolysat)

A n t o n a c o p o u l o s (1963) und
L y m a n a n d T h o m a s (1965) benutz-
ten für die Auswertung das Maximum bei $365\text{ m}\mu$,
ebenso wurde bei den eigenen Untersuchungen
verfahren (vergl. hierzu Abb. C 10, Maxima der
A-Werte und Abb. C 11, Maxima der B-Werte).

C a r p e n t e r (1960) verwendet in seiner
Arbeitsvorschrift für die Auswertung die Ex-
tinktion bei $435\text{ m}\mu$. Auf Rückfrage gab
C a r p e n t e r (1965) dafür folgende Grün-
de an:

- " 1) Bei der Wellenlänge $435\text{ m}\mu$ gibt es noch
eine ausreichende Extinktion.
- 2) Die Verwendung dieser Wellenlänge ermög-
licht die Bestimmung mit einem Filterge-
rät im Bereich des sichtbaren Lichtes auch
für die Institute, die nicht mit einem
Prismengerät ausgestattet sind.
- 3) Außerdem könnten u. U. bei $365\text{ m}\mu$ andere,
beim sichtbaren Licht farblose DNP-Verbin-
dungen, die Bestimmung stören. Allerdings
sind solche Verbindungen, z. B. durch
chromatographische Analyse im UV-Licht,
bisher noch nicht festgestellt worden."

Der Hauptgrund für die Ablesung der Extinktion
bei $435\text{ m}\mu$ scheint demnach zu sein, daß
C a r p e n t e r (1960) ein Filtergerät be-
nutzt hat. In seiner Arbeitsvorschrift erwähn-
te er, daß bei Ablesung der Extinktion mit dem
Filter 601 Hilger bei $435\text{ m}\mu$ durchgeführt wurde.

Herstellung der Eichkurve: Für die Herstellung
der Eichkurve wurden $10\text{ mg } \mathcal{E}\text{-DNP-Lysin-Chlorid}$
in etwa 20 ml Methanol gelöst und dann mit
 1 n HCl -Lösung auf 200 ml aufgefüllt. Diese
Stammlösung enthält folglich $50\text{ }\mu\text{g } \mathcal{E}\text{-DNP-Lysin-}$
 $\text{Chlorid} / 1\text{ ml}$ bzw. $100\text{ }\mu\text{g} / 2\text{ ml}$.

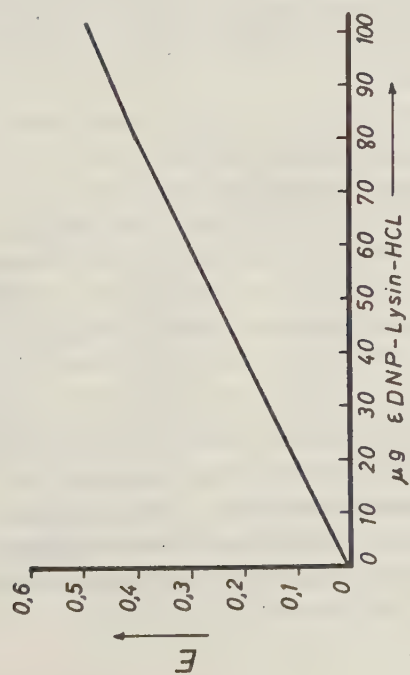


Abb. C12 verfügbares Lysin-Eichkurve

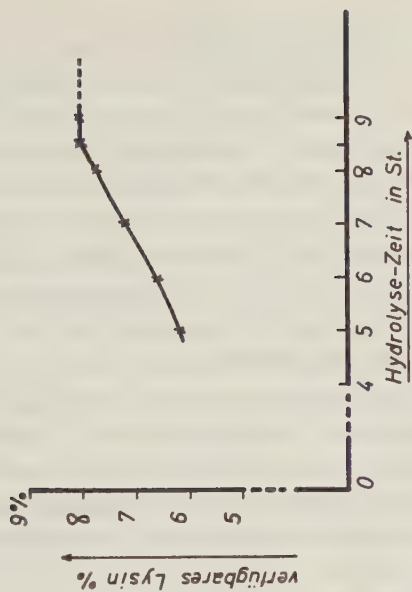


Abb. C13 Einfluß der Hydrolyse-Dauer auf den Gehalt an verfügbarem Lysin

Von dieser Stammlösung wurde folgende Verdünnungsreihe hergestellt: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 und 50 ml Stammlösung wurden je mit n-HCl auf 50 ml aufgefüllt. Das ergibt Lösungen, die 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 und 100 μ g / 2 ml enthalten. Auf 2 ml wird bezogen, da später die Bestimmung aus 2 ml Hydrolysat erfolgt. In Abb. C 12 ist die Eichkurve dargestellt.

2.3.2. Die Hydrolyse des Lysins

Die Hydrolyse wurde am Rückfluß (Steigrohr) durchgeführt. Da die Temperatur so niedrig wie möglich gewählt werden soll, erwies sich eine Temperatur von 130° C (elektrische Batterie) als ausreichend, um die Lösung bei leichtem Sieden zu halten.

Um die günstigste Zeit festzustellen wurden Versuche mit steigender Hydrolyse-Dauer durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der folgenden Tabelle C 7 zusammengefaßt. (Vergl. Abb. C 13)

Tab. C 7: Einfluß der Hydrolyse bei der
Filet Gt-Probe

Hydrolyse- Dauer St.	Verfügbares Lysin %	Hydrolyse- Dauer St.	Verfügbares Lysin %
5	6,30	8	7,80
6	6,60	8 1/2	8,00
7	7,20	9	8,04

Daraus ist zu ersehen, daß eine Zeit von 9 Stunden ausreichend ist. Die Erhöhung der Hydrolysedauer brachte eine Erniedrigung der Werte mit sich. Die Zeit der Hydrolyse wurde vom Beginn des Siedens an gerechnet.

2.3.3. Einfluß der Trocknungstemperatur auf den Gehalt an verfügbarem Lysin

Aus Tabelle C 8 und Abb. C 14 ergibt sich, daß der Einfluß der Trocknungstemperatur auf den Gehalt an "verfügbarem Lysin" von der Art des untersuchten Proteins abhängig ist.

Beim Filet z. B. macht sich dieser Einfluß bei Temperaturen über 70° C bemerkbar. Die Erhöhung der Trocknungstemperatur auf 100° C ist mit einem Verlust von etwa 13 % verbunden. Anders sieht es beim "Ganzfisch" und beim "Abfall" aus. Beim Protein des Ganzfisches und dem der Abfälle ergab sich nur bei einem Vergleich der Proben der Gefriertrocknung mit denen der Vakuumtrocknung bei 40° C und der Lufttrocknung bei 70° bzw. 100° C ein Verlust an "verfügbarem Lysin" von 5 % (Ganzfisch) bzw. 3 % (Abfall). Ein Unterschied zwischen den durch Erhitzen getrockneten Proben (40 , 70 , 100° C) konnte hier nicht festgestellt werden.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von C a r p e n t e r und L e a (1961) überein. Sie haben festgestellt, daß beim hocherhitzten Heringsmehl (130° C) 50 % des verfügbaren Lysins im Vergleich zum gefriergetrockneten Heringsmehl verloren gehen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß das Heringsmehl viel mehr Fett enthält, dadurch ist der Einfluß der Trocknungstemperatur auf den Gehalt an verfügbarem Lysin im Heringsmehl ausgeprägter.

C a r p e n t e r et al. (1957) haben festgestellt, daß Trocknungstemperaturen über 100° C, im Vergleich zur Vakuumtrocknung bei 60° C, einen negativen Einfluß auf den Gehalt

Tabelle C 8 - Der Gehalt an " verfügbarem Lysin " in den verschiedenen Fischmehlen bei verschiedenen Trocknungstemperaturen

Fischmehl	No	A-Wert	Ø	B-Wert	Ø
Filet Gt	56	10,05	10,47	7,91	8,00
	67	10,39		8,04	
Filet 40° C	76	9,70	9,89	8,02	8,08
	77	10,08		8,14	
Filet 70° C	74	9,67	9,35	7,73	7,35
	75	10,03		8,05	
Filet 100° C	93	8,14	9,25	7,33	7,03
	95	9,37		6,73	
ganzer Fisch. Gt	13	9,27	9,14	7,35	7,18
	14	9,02		7,02	
ganzer Fisch 40° C	15	9,16	8,89	7,23	6,89
	17	8,63		6,55	
ganzer Fisch 70° C	46	8,73	8,77	6,68	6,87
	47	8,32		6,96	
ganzer Fisch 100° C	48	8,54	8,72	6,80	6,78
	49	8,91		6,76	
Abfall Gt	84	8,23	8,26	6,46	6,54
	85	8,30		6,62	
Abfall 40° C	62	8,45	8,20	6,28	6,23
	63	7,95		6,18	
Abfall 70° C	60	9,14	9,03	6,50	6,46
	61	8,92		6,43	
Abfall 100° C	58	8,46	8,38	6,40	6,32
	59	8,30		6,24	
Fischmehl x	8	8,57	8,26	6,55	6,25
	91	7,76		6,00	

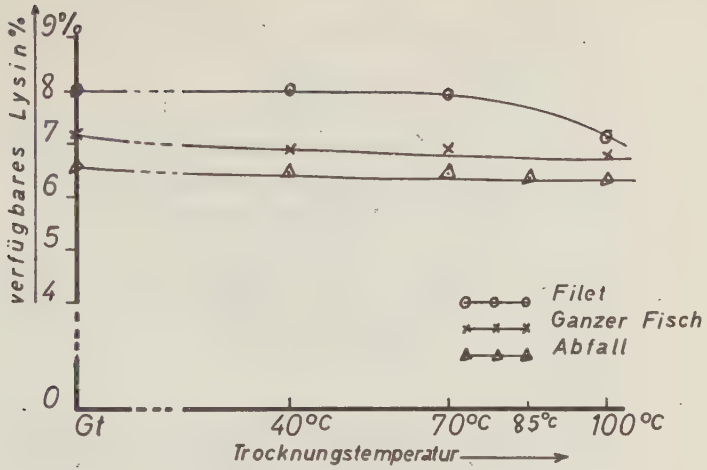


Abb. C14 Einfluß der Trocknungstemperatur auf den Gehalt an verfügbarem Lysin

an verfügbarem Lysin im Filet des Kabeljaus hervorrufen.

Nach L a k s e s v e l a (1958) und L a r o y (1961) nimmt der Gehalt an verfügbarem Lysin in Fischmehlen umso mehr ab, je höher die Trocknungstemperatur ist.

Nach O l l e y and W a t s o n (1961) hat das azeotrope Trocknungsverfahren (80° C) keinen Einfluß auf den Gehalt an verfügbarem Lysin im Fischmehl.

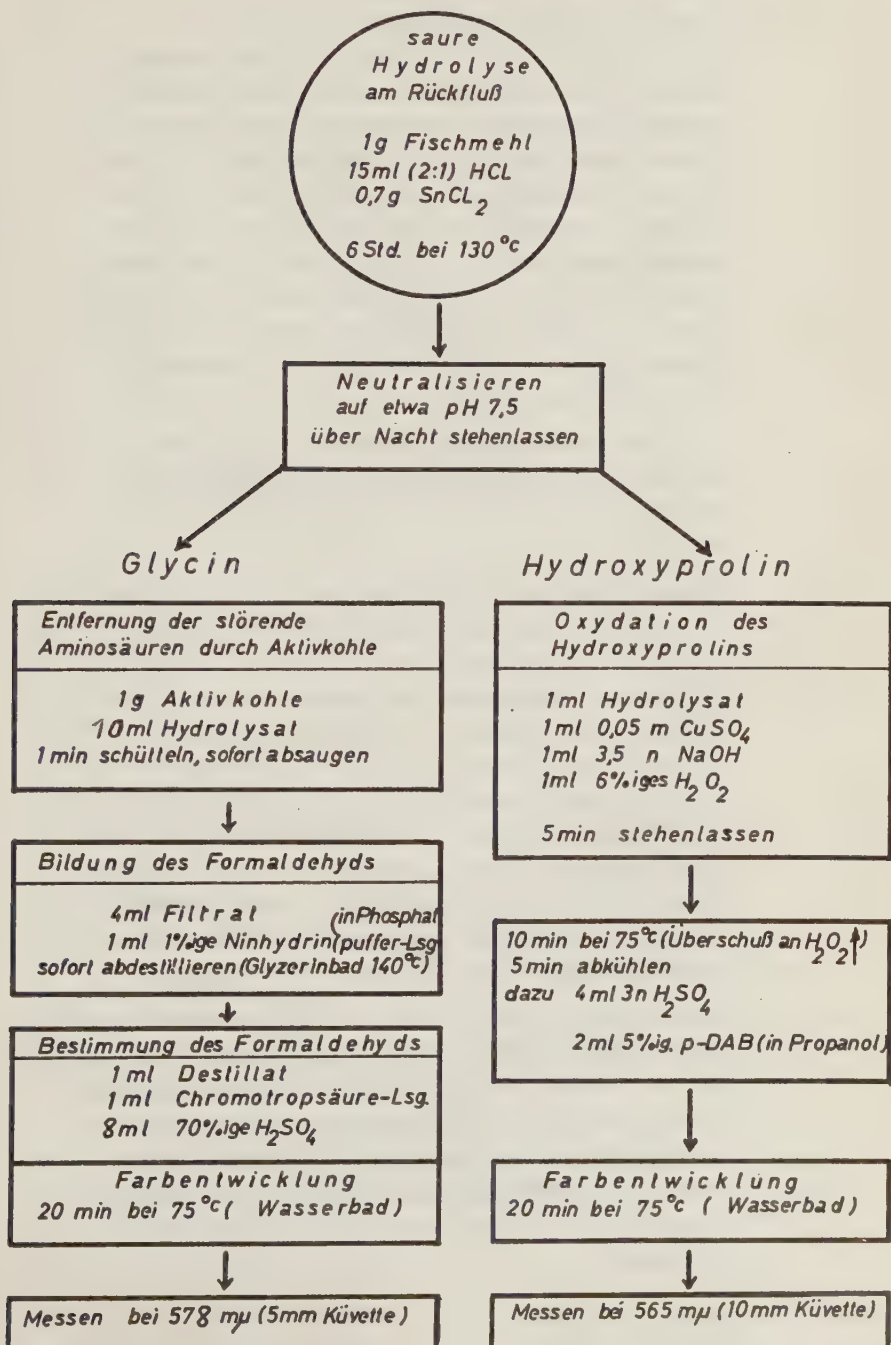
Unter Berücksichtigung der o. a. Literaturangaben und der eigenen Ergebnisse ist festzustellen, daß der Einfluß der Trocknungstemperatur auf den Gehalt an verfügbarem Lysin im Fischprotein nicht von einem sondern von mehreren Faktoren abhängig ist, und zwar:

- 1) vom Trocknungsverfahren (Gefriertrocknung, azeotrope Vakuum- bzw. Lufttrocknung);
- 2) von der Trocknungstemperatur (unter bzw. über 100° C);
- 3) von der Art des untersuchten Proteins (Filet, Ganzfisch oder Abfall);
- 4) von der Zusammensetzung des untersuchten Fischmehls (z. B. Gehalt an Fett)

2.4. Bestimmung des Glycins und des Hydroxyprolins

Das Glycin und das Hydroxyprolin wurden in der vorliegenden Arbeit nach A n t o n a c o - p o u l o s (1957) bestimmt. Da beide Aminosäuren Bestandteile der Bindegewebe (geringwertige Proteine) sind, sowie die Bestimmung aus demselben Hydrolysat erfolgt, werden sie hier gemeinsam behandelt. In Abb. C 15 sind die beiden Bestimmungsmethoden schematisch dargestellt.

Abb. C15 Schematische Darstellung der Bestimmung des Glycins und des Hydroxyprolins



2.4.1. Herstellung der Eichkurven

Herstellung der Glycin-Eichkurve: Nach Antonacopoulos (1957) werden genau 25 mg Glycin zur Herstellung der Eichkurve eingewogen, in Wasser gelöst und in einem Meßkölbchen auf 100 ml aufgefüllt. Von dieser Stammlösung, die $250\mu\text{g}$ Glycin / 1 ml enthält, werden je 4, 8, 12, 16 und 20 ml in Meßkölbchen auf 100 ml aufgefüllt. Das ergibt Lösungen, die 10, 20, 30, 40 und $50\mu\text{g}$ Glycin / 1 ml enthalten. Diese Stammlösungen werden der Adsorption, Destillation und der Farbreaktion unterworfen.

Die Ergebnisse sind in Abb. C 16 dargestellt. Es empfiehlt sich aus dem oben gesagten, mit Konzentrationen zwischen 20 und $50\mu\text{g}$ zu arbeiten.

Herstellung der Hydroxyprolin-Eichkurve: Nach Antonacopoulos (1957) werden genau 25 mg Hydroxyprolin zur Herstellung der Eichkurve eingewogen, in Wasser gelöst und in einem Meßkölbchen auf 100 ml aufgefüllt. Von dieser Stammlösung, die $250\mu\text{g}$ Hydroxyprolin / 1 ml enthält, werden je 2, 4, 6, 8 und 10 ml in Meßkölbchen auf 100 ml aufgefüllt. Das ergibt Lösungen, die 5, 10, 15, 20 und $25\mu\text{g}$ Hydroxyprolin / 1 ml enthalten. Diese Standardlösungen werden der Farbreaktion unterworfen. Die Ergebnisse sind in Abb. C 17 dargestellt.

Verdünnung 1 und 5 wurden für die Berechnung des Faktors nicht berücksichtigt. Bei 1 ist die Konzentration für eine sehr genaue Messung etwas zu gering, bei 5 hingegen ist sie etwas zu stark, so daß das Lambert-Beer Gesetz nicht mehr voll gültig ist. Es empfiehlt sich, mit Konzentrationen zwischen 10 und $20\mu\text{g}$ zu arbeiten.

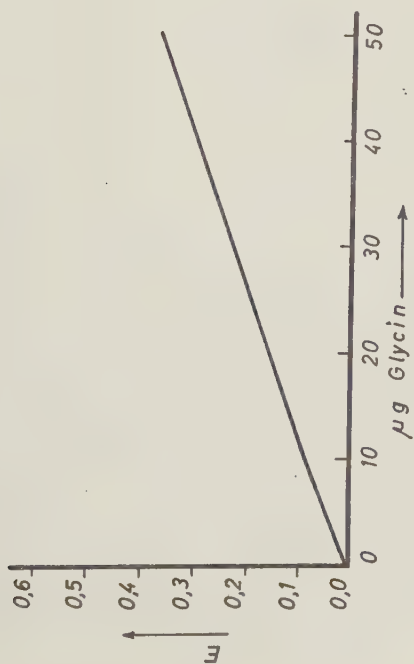


Abb. C16 Glycin-Eichkurve

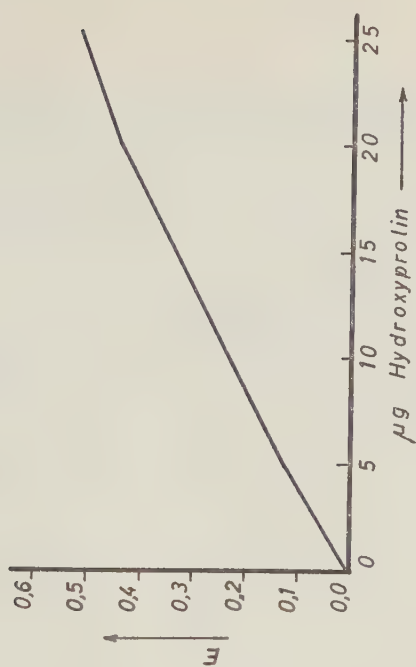


Abb. C17 Hydroxyprolin-Eichkurve

Maxima der Extinktionen: In Abb. C 18 und C 19 sind die Maxima der Extinktionen für Glycin und für Hydroxyprolin dargestellt.

2.4.2. Die Hydrolyse des Glycins und Hydroxyprolins

Tab. C 9: Einfluß der Hydrolysedauer

(Probe: Abfallmehl 70° C)

Nr.	Hydrolyse Dauer in St.	Glycin %		Hydroxyprolin %	
13	2	6,14	6,09	1,91	1,91
14		6,04		1,92	
15	3	6,06	6,13	1,97	1,97
16		6,20		1,98	
17	4	6,26	6,28	1,98	2,00
18		6,30		2,02	
7	5	6,35	6,36	1,96	1,98
8		6,36		1,99	
9	6	6,66	6,63	2,10	2,12
10		6,61		2,15	
11	7	6,40	6,38	2,08	2,07
12		6,36		2,07	

Hydrolysedauer: Aus Tabelle C 9 ist zu ersehen, daß die Hydrolyse nach einer Zeit von 6 Stunden bei beiden Aminosäuren abgeschlossen ist. Wie aus Abb. C 20 ersichtlich ist, zeigt die Glycin-Kurve einen regelmäßigen Verlauf, mit einem kleinen Maximum nach 6-stündigem Erhitzen. Die Hydroxyprolin-Kurve (vergl. Abb. C 20) verläuft flacher, mit einem kleinen Maximum ebenfalls nach 6-stündiger Hydrolyse. Bei Erhöhung der Dauer der Hydrolyse über 7 Stunden muß mit geringen Verlusten gerechnet werden.

Abb. C18 Absorptionskurve des Glycins (20 µg/ml)

Methode : Antonacopoulos

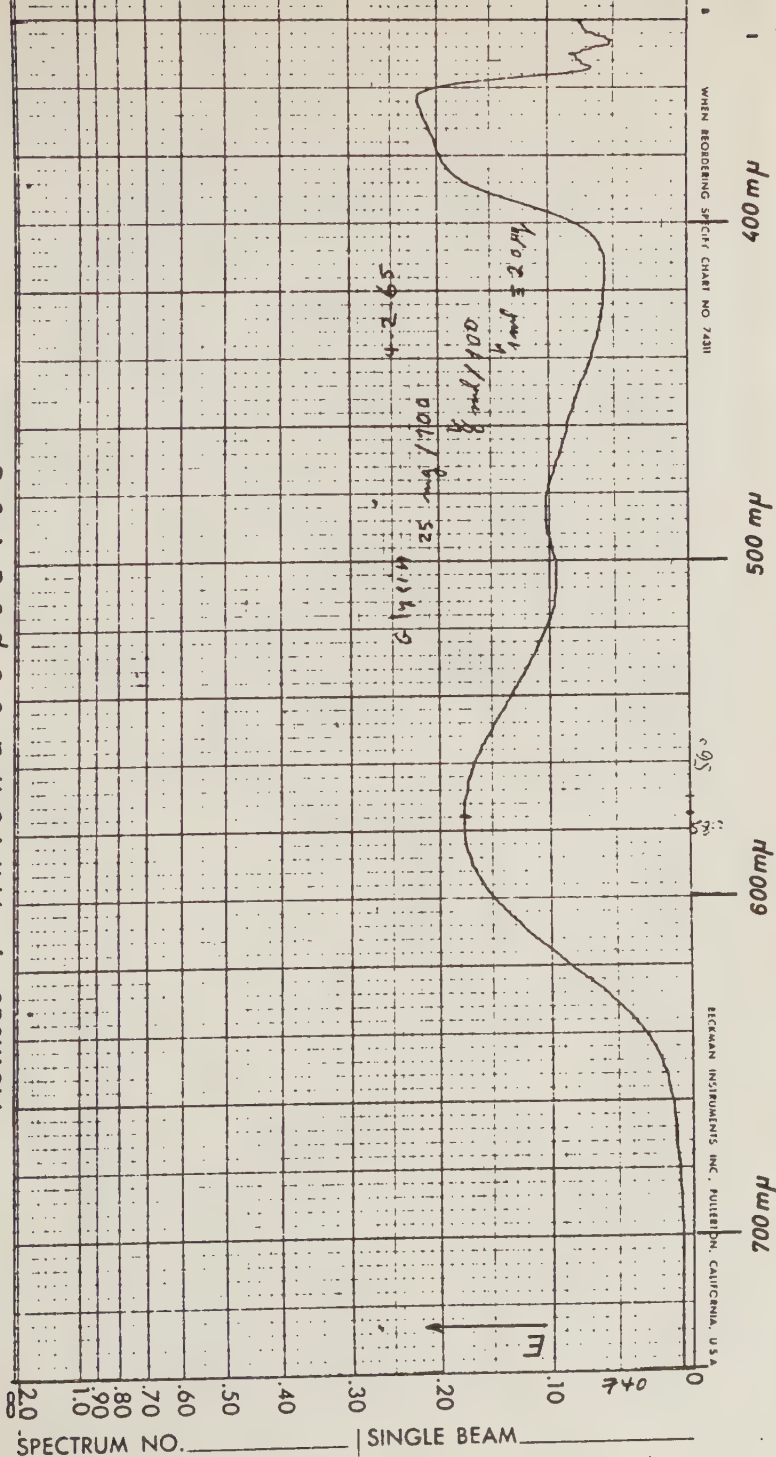
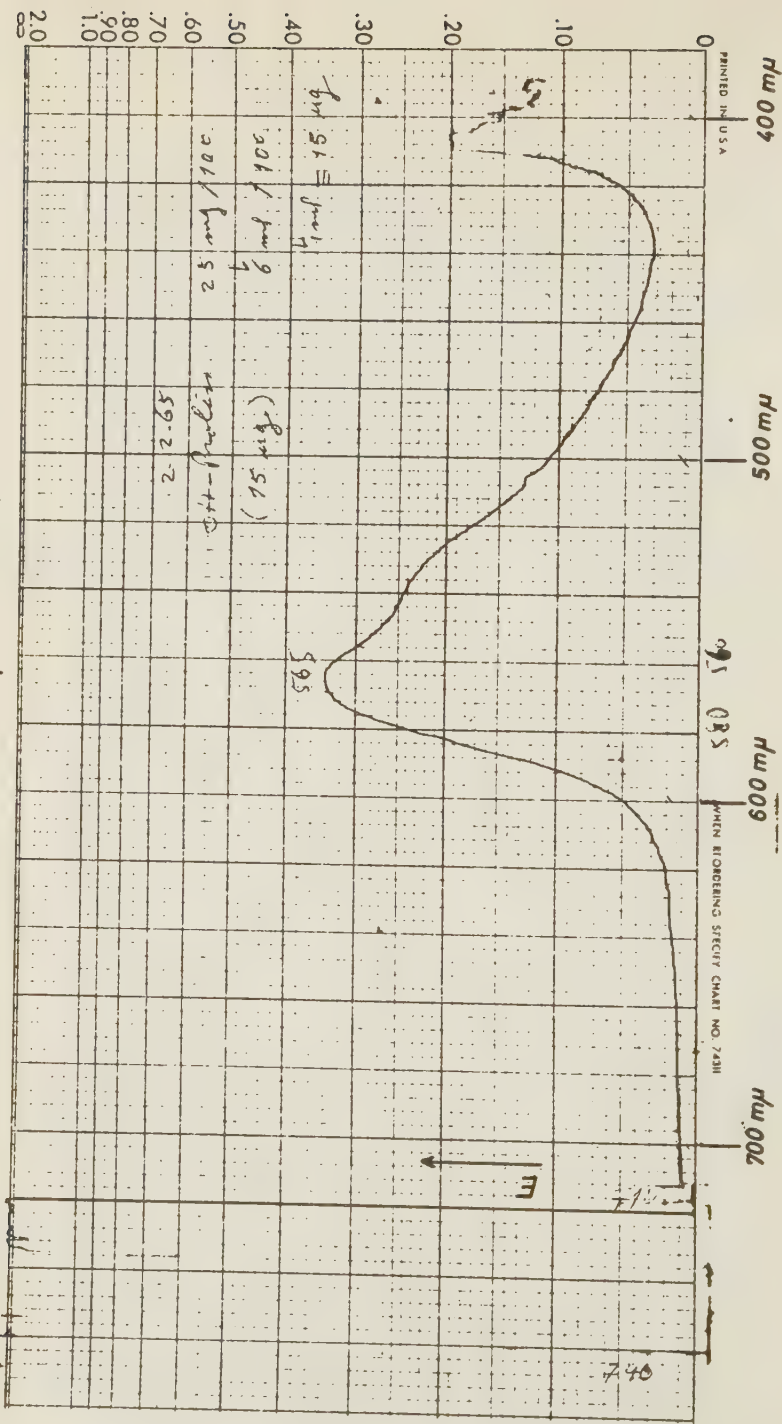


Abb. C19 Absorptionskurve des Hydroxyprolins (15 $\mu\text{g/ml}$)
Methode : Antonapoulos



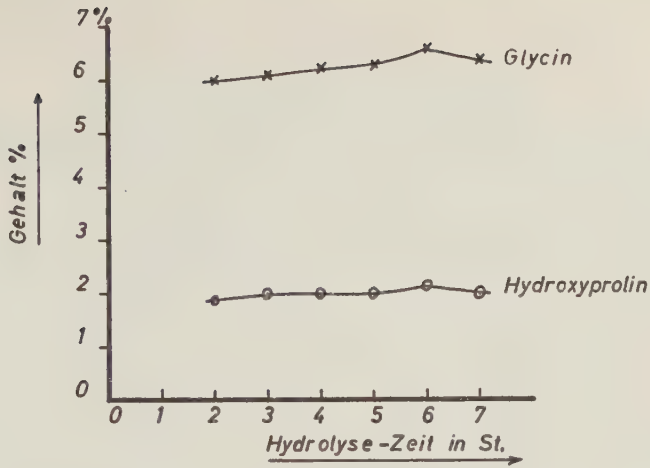


Abb.C20 Einfluß der Hydrolyse-Dauer auf den Gehalt an Glycin und Hydroxyprolin.

Tabelle C 10 - Der Gehalt an Glycin und an Hydroxyprolin
in den verschiedenen Fischmehlen bei verschie-
denen Trocknungstemperaturen

Fischmehl	No	Glycin %		Hydroxyprolin %	
Filet Gt	35	1,09	1,16	0,28	0,31
	36	1,23		0,33	
Filet 40° C	37	1,14	1,16	0,31	0,30
	38	1,18		0,30	
Filet 70° C	39	1,07	1,10	0,30	0,30
	40	1,14		0,30	
Filet 100° C	41	1,05	1,07	0,28	0,29
	42	1,10		0,30	
ganzer Fisch Gt	25	4,44	4,43	1,37	1,36
	26	4,42		1,34	
ganzer Fisch 40°C	27	4,20	4,25	1,35	1,35
	28	4,31		1,36	
ganzer Fisch 70°C	29	4,38	4,31	1,42	1,39
	30	4,24		1,36	
ganzer Fisch 100°C	31	4,30	4,26	1,38	1,38
	32	4,22		1,38	
Abfall Gt	19	6,55	6,56	2,14	2,16
	20	6,57		2,19	
Abfall 40° C	21	6,47	6,57	2,11	2,12
	22	6,68		2,13	
Abfall 70° C	9	6,69	6,66	2,10	2,12
	10	6,64		2,15	
Abfall 100° C	23	6,31	6,27	1,99	1,98
	24	6,22		1,96	
Fischmehl X	33	5,99	5,89	1,92	1,86
	34	5,79		1,85	

2.4.3. Einfluß der Trocknungstemperatur auf den Gehalt an Glycin und Hydroxyprolin

Wie aus Tabelle C 10 ersichtlich, ist das Glycin wie auch das Hydroxyprolin gegenüber der Hitzebehandlung sehr beständig. In allen der drei verschiedenen Fischmehlsorten (Filet, Ganzfisch und Abfall), hat die Trocknungstemperatur keine negative Wirkung hervorgerufen.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von A n t o n a c o p o u l o s (1964) überein, der auch den Einfluß der Temperaturen von 100 - 200° C auf den Gehalt an Glycin und Hydroxyprolin in Fischmehlen studiert hat.

H e i n z e (1955) stellte auch fest, daß das Glycin eine der am wenigsten empfindlichen Aminosäuren darstellt, insbesondere bei der sauren Hydrolyse bei 112° C bis zu 8 Stunden Erhitzungsdauer.

Über den Einfluß der Verarbeitung bzw. der Trocknungstemperatur auf den Gehalt an Glycin oder Hydroxyprolin im Fischprotein finden sich sonst in der Literatur keine Daten, da diese beiden Aminosäuren wahrscheinlich für die Qualitätsbeurteilung von Fischproteinen bzw. Fischmehlen bis jetzt als nicht von Bedeutung angesehen worden sind.

2.5. Der Zusammenhang zwischen den Aminosäuren

Tryptophan, Glycin und Hydroxyprolin

Aus den Ergebnissen der chemisch-analytischen Bestimmungen der Aminosäuren "verfügbares Lysin", Tryptophan, Glycin und Hydroxyprolin geht folgendes hervor:

- 1) Das verfügbare Lysin ist gegenüber der Hitzebehandlung labil.
- 2) In dem Gehalt an verfügbarem Lysin spiegelt sich u. a. die Trocknungstemperatur wider. Deshalb eignet sich das "verfügbare Lysin" ganz besonders, um Aufschluß über die Einflüsse der Verarbeitung des zu prüfenden Mehls zu gewinnen und damit auch auf seinen Nährwert. Über die Eignung des "verfügbaren Lysins" für die biologische Bewertung von Fischproteinen auf chemischem Wege wird später in: "Der Zusammenhang zwischen dem Gehalt an "verfügbarem Lysin" und den "biologischen Bewertungsmaßstäben" näher eingegangen.
- 3) Die Aminosäuren Tryptophan, Glycin und Hydroxyprolin sind gegenüber der Hitzebehandlung sehr stabil, d. h. ihre Gehalte bleiben auch bei höheren Temperaturen bis 100° C bei den eigenen Versuchen und bis 180° C nach Antonopoulos (1964) konstant.
- 4) Zwischen dem Gehalt an den drei Aminosäuren Tryptophan, Glycin und Hydroxyprolin im Filet- bzw. im Ganzfisch-Protein bzw. im Abfall-Protein besteht ein sehr enger Zusammenhang. (Vergl. Tabelle C 11) Es ist damit möglich, eine Aussage über den Aufbau des Fischproteins (Filetprotein, Ganzfischprotein oder Abfallprotein) zu machen.

"Einblick in den Aufbau des Proteins"

Verhältnisse von Tryptophan, Glycin und Hydroxyprolin untereinander in den verschiedenen Fischmehlen.

Probe	Trypt./Glycin	Trypt./OH-Prolin	Glycin/OH-Prolin	OH-Prolin gehalt %
Filet Gt	1,45 : 1	5,42 : 1	3,74 : 1	0,31
Filet 40°C	1,44	5,48	3,80	0,30
Filet 70°C	1,43	5,36	3,63	0,30
Filet 100°C	1,52	5,47	3,66	0,29
		5,43 : 1 =====	3,70 : 1 =====	1 =
ganz Gt	0,316 : 1	1,02 : 1	3,26 : 1	1,36
ganz 40°C	0,324	1,02	3,15	1,35
ganz 70°C	0,332	1,00	3,10	1,39
ganz 100°C	0,333	1,02	3,09	1,38
		1 :	3,15 :	1
Abfall Gt	0,176 : 1	0,537 : 1	3,04 : 1	2,16
Abfall 40°C	0,174	0,537	3,09	2,12
Abfall 70°C	0,172	0,566	3,27	2,12
Abfall 100°C	0,199	0,631	3,17	1,98
		0,56 :	3,14 :	1
F.M. 85°C	0,175 : 1	0,547 : 1	3,13 : 1	1,88

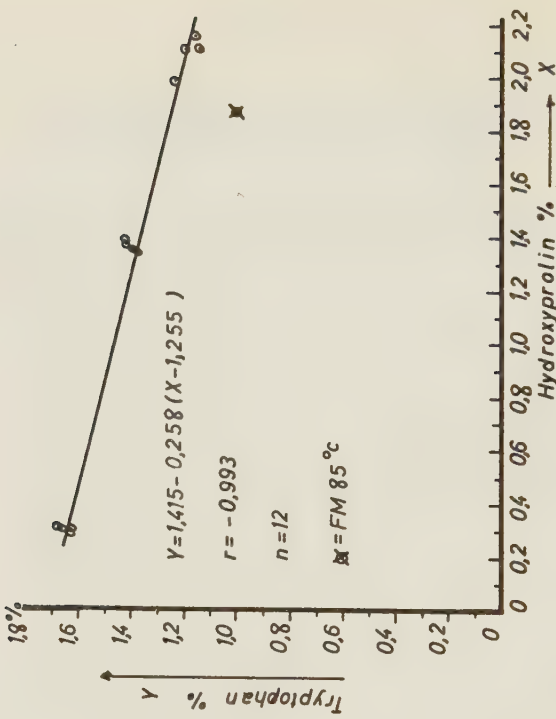


Abb. C22 Der Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Tyriophan und Hydroxyprolin im Kabeljau-Protein.

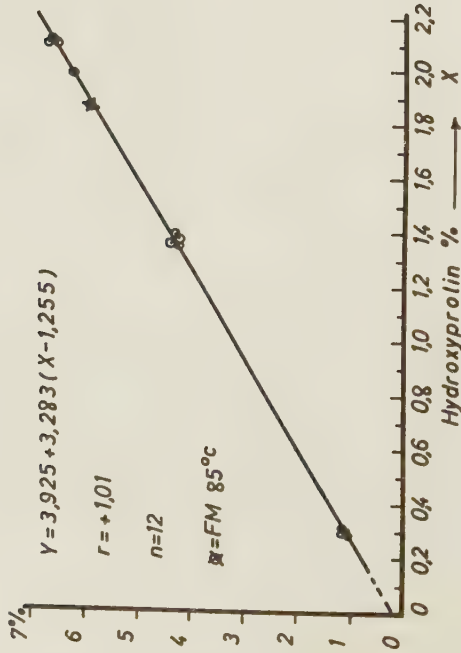


Abb. C21 Der Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Glycin und Hydroxyprolin im Kabeljau-Protein.

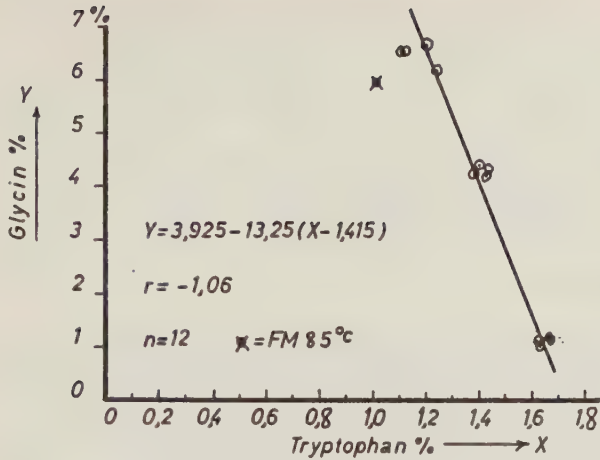


Abb.C 23 Der Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Glycin und Tryptophan im Kabeljau-Protein.

In Abb. C 21 ist die Regressionslinie zwischen dem Gehalt an Glycin und dem an Hydroxyprolin in den drei Fischproteinarten (Filet, Ganzfisch, Abfall) wiedergegeben. Es handelt sich hier um einen positiven linearen Zusammenhang, mit einem sehr hohen Korrelationskoeffizienten $r = + 1,01$; dieser ist statistisch gesichert ($P < 0,01$), da $t = 0,01$, 11 mindestens $\pm 0,69$ als Zufallswert betragen soll.

In Abb. C 22 ist die entsprechende Regressionslinie zwischen dem Gehalt an Tryptophan und dem an Hydroxyprolin aufgezeigt. Hier handelt es sich um einen negativen linearen Zusammenhang mit einem sehr hohen Korrelationskoeffizienten $r = - 0,990$, dieser ist ebenfalls statistisch gesichert ($P < 0,01$).

Ein ähnliches Verhalten besteht zwischen dem Gehalt an Glycin und dem an Tryptophan, mit einem ebenfalls sehr hohen Korrelationskoeffizienten $r = - 1,06$ (s. Abb. C 23), der statistisch gesichert ist ($P < 0,01$).

2.5.1. Zum Aufbau des Filet-Proteins

In Tabelle C 11 sind die Verhältnisse der drei Aminosäuren zueinander angegeben. Die Verhältnisse Tryptophan / Glycin, Tryptophan / Hydroxyprolin und Glycin / Hydroxyprolin sind stets konstant mit den drei Faktoren $1,48 \pm 0,04$ bzw. $5,43 \pm 0,06$ bzw. $3,70 \pm 0,09$. Die drei Variationen ($\frac{s}{x} \cdot 100$) liegen innerhalb der analytischen Fehlergrenze.

Wenn der Gehalt an Hydroxyprolin (0,30 % auf R.P. bezogen) als 10 eingesetzt wird, bilden sich aus den beiden letzten Faktoren die folgenden Gewichtsverhältniszahlen (GVZ) bzw.

Molekülverhältniszahlen (MVZ) für diese drei Aminosäuren im Filet-Protein:

	Try	Gly	Hypro
GVZ	54,3	37	10
	$\frac{54,3}{204} = 0,266$	$\frac{37}{75} = 0,49$	$\frac{10}{131} = 0,076$
MVZ	35	64	10

Aus den GVZ und dem Molekulargewicht wurden die zu erwartende Anzahl an Molekülen für jede Aminosäure errechnet. Wenn die zu erwartende Molekülzahl des Hydroxyprolins als 10 eingesetzt wird, bilden sich die o.a. Molekülverhältniszahlen (MVZ).

Mit diesen Zahlen sind die Verhältnisse der drei Aminosäuren zueinander, die sich am Aufbau vom Protein des Filets gewichtsmäßig (GVZ) und zahlenmäßig (MVZ) beteiligen, zum Ausdruck gebracht.

Interessant dabei ist, daß das Glycin im Vergleich zum Tryptophan mit einer nahezu doppelten Anzahl von Molekülen am Aufbau des Filet-Proteins beteiligt ist, obwohl der gewichtsmäßige Anteil wesentlich kleiner ist. Das ist durch sein viel kleineres Molekulargewicht zu erklären.

2.5.2. Zum Aufbau des Ganzfisch-Proteins

Aus Tabelle C 11 geht ebenfalls hervor, daß die Verhältnisse Tryptophan/Glycin; Tryptophan/Hydroxyprolin und Glycin/Hydroxyprolin stets konstant sind. Die entsprechenden Faktoren betragen 0,33 bzw. 1,02 bzw. 3,15. Ferner ist

aus der Tabelle zu entnehmen, daß das Verhältnis Hydroxyprolin im Ganzfisch / Hydroxyprolin im Filet = 4,57 : 1 beträgt. Unter Berücksichtigung dieses Verhältnisses, ergeben sich für das Protein des ganzen Fisches folgende GVZ und MVZ (wiederum die Anzahl der Hydroxyprolin-Moleküle = 10 gesetzt):

	Try	Gly	Hypro
GVZ	46,6	144	45,7
	$\frac{46,6}{204} = 0,228$	$\frac{144}{75} = 1,92$	$\frac{45,7}{131} = 0,348$
	$\frac{0,228}{0,348} \cdot 46$	$\frac{1,92}{0,348} \cdot 46$	$\frac{0,348}{0,076} \cdot 10$
MVZ	30	255	46

Beim Vergleich der GVZ und MVZ für das Ganzfisch-Protein mit denen für das Filet-Protein ergibt sich, daß die Änderung im Molekülaufbau des Ganzfisches zum größten Teil durch eine Zunahme an den nicht essentiellen Aminosäuren Glycin und Hydroxyprolin verursacht wird, wodurch das Verhältnis der essentiellen zu den nicht essentiellen Aminosäuren erheblich verschoben wird.

Interessant ist auch, daß der Anteil des Hydroxyprolins zwar gewichtsmäßig dem des Tryptophans gleicht, jedoch ist das Hydroxyprolin wegen seines geringeren Molekulargewichtes mit einer weit größeren Anzahl von Molekülen am Aufbau des Proteins beteiligt.

2.5.3. Zum Aufbau des Abfall-Proteins

Der oben beschriebene Weg wurde auch hier

beschrifteten, um die GVZ und MVZ für das Protein des Abfalls zu ermitteln. Unter Berücksichtigung der Beziehung: Hydroxyprolin im Abfall / Hydroxyprolin im Filet von 7 : 1 (Anzahl der Moleküle an Hydroxyprolin im Filet = 10), ergeben sich für das Protein des Abfalls folgende GVZ und MVZ:

	Try	Gly	Hypro
GVZ	39,2	219,8	70
	$\frac{39,2}{204} = 0,191$	$\frac{219,8}{75} = 2,93$	$\frac{70}{131} = 0,535$
	$\frac{0,191}{0,531} \cdot 70$	$\frac{2,93}{0,535} \cdot 70$	$\frac{0,535}{0,076} \cdot 10$
MVZ	= 25	384	70

Hier tritt ganz besonders deutlich die schon beim Ganzfisch festzustellende Zunahme der GVZ und MVZ zugunsten der nicht-essentiellen Aminosäuren insbesondere des Glycins in Erscheinung.

2.5.4.Tab. C 10: Zusammenfassende Übersicht zum Aufbau der Fischproteine

	Verhältniszahl	Tryptophan	Glycin	Hydroxyprolin
Filet	GVZ	54	37	10
	MVZ	35	64	10
Ganzfisch	GVZ	46	144	46
	MVZ	30	255	46
Abfall	GVZ	39	220	70
	MVZ	25	384	70

Während die Zunahme bzw. Abnahme der MVZ und GVZ beim Tryptophan relativ gering ist, ist sie dagegen beim Glycin bzw. Hydroxyprolin wesentlich deutlicher. Der Unterschied zwischen einem hochwertigen Protein (z. B. Filet) und einem weniger wertigen Protein (z. B. Abfall) besteht nicht nur darin, daß die Menge einer essentiellen Aminosäure (z. B. Tryptophan) mehr bzw. weniger wird, sondern u. a. auch darin, daß das Verhältnis der Aminosäuren zueinander von vornherein anders liegt.

2.6. Zusammenfassung der chemischen Bewertung

Mit Hilfe der in dieser Arbeit benutzten chemischen Bewertungsmaßstäbe, insbesondere durch die Bestimmung des Gehalts an "verfügbarem Lysin", konnten im allgemeinen sowohl die Gehaltsunterschiede zwischen den untersuchten Fischmehlen (Filet, Ganzfisch, Abfall) als auch der Einfluß steigender Trocknungstemperaturen (Gt, 40° C, 70° C, 100° C) auf den Gehalt an "verfügbarem Lysin" nachgewiesen werden.

Durch die Bestimmung des "Pepsin-Salzsäure-Wertes" konnte zwar ein Einfluß steigender Trocknungstemperaturen auf den Gehalt an verdaulichem Rohprotein aufgezeigt werden (am stärksten beim Filetmehl), jedoch ist es nicht möglich auf Grund ihres Gehaltes an verdaulichem Rohprotein allein Qualitätsunterschiede bei den untersuchten Fischmehlsorten (Filet, Ganzfisch, Abfall) festzustellen.

Die Aminosäuren Tryptophan, Glycin und Hydroxyprolin werden dagegen, und zwar bei allen Proteinarten (Filet, Ganzfisch, Abfall) nicht durch steigende Trocknungstemperaturen im gegebenen Bereich (bis 100° C) beeinflusst; ihre Gehalte bleiben unverändert. Diese Aminosäuren stehen stets in einem konstanten Verhältnis zueinander und zwar abhängig von der Proteinart. Diese Ergebnisse fanden in den Gewichtsverhältniszahlen (GVZ) und den Molekularverhältniszahlen (LVZ) ihren Niederschlag. Mit diesen Verhältniszahlen ist ein Einblick in den jeweiligen Aufbau des untersuchten Proteins möglich.

Eine für die Praxis wichtige Aussage kann mit Hilfe einer Gegenüberstellung der Gehalte an "verfügbarem Lysin" und der Glycin bzw.

Hydroxyprolin-Werte gemacht werden. Durch die deutliche Zunahme der Gehalte an Glycin bzw. Hydroxyprolin von Filet (1 % bzw. 0,3 %) über Ganzfisch (4,5 % bzw. 1,4 %) zu den Fischabfällen (6,4 % bzw. 2,1 %) ist es möglich, auch Aussagen über die Herkunft eines Fischmehls zu machen, während durch das "verfügbare Lysin" Rückschlüsse über die Einflüsse der Verarbeitung (Trocknungstemperatur über bzw. unter 100° C) gezogen werden kann (vergl. hierzu Tabelle C 12).

Tab. C 12: Die in den drei Versuchsmehlen gefundenen "verfügbaren Lysin"- bzw. Glycin- und Hydroxyprolin-Werte und ihre Aussagemöglichkeit für die Feststellung der Herkunft und Verarbeitung von Fischmehlen aus Kabeljau.

Gehalt an "verfügba- rem Lysin"	Gehalt an Glycin bzw. Hydroxyprolin	Herkunft des Fischmehls	Trocknungs- temperatur
> 8 %	ca 1 % bzw. 0,3 %	aus Filet	< 100° C
< 8 %	" "	" "	> 100° C
> 7 %	ca 4,3 % bzw. 1,4 %	aus Ganz-	< 100° C
< 7 %	" "	fisch	> 100° C
> 6,5 %	ca 6,5 % bzw. 2,1 %	aus Fisch-	< 100° C
< 6,5 %	" "	abfällen	> 100° C

D Diskussion der Zusammenhänge zwischen den chemischen und den biologischen Bewertungsmaßstäben

1. Vergleich der Pepsin-Salzsäure-Werte mit den biologischen Verdaulichkeitskoeffizienten

Die Ergebnisse der Verdaulichkeitsbestimmung der Filet-, Ganzfisch- und Abfallmehle "in vitro" (Pepsin-Salzsäure-Wert) und die der Verdaulichkeitsbestimmung "in vivo" (scheinbare bzw. wahre Verdaulichkeit) sind in der folgenden Tabelle gegenübergestellt.

Tab. D 1: Vergleich der Verdaulichkeit "in vivo" und "in vitro"

	scheinbare Verdaulichkeit	wahre Verdaulichkeit	Pep.- HCl-Wert
Filet Gt	92,78 ± 0,79	99,72 ± 0,75	98,24
Filet 40° C	91,82 ± 1,47	98,01 ± 0,38	97,45
Filet 70° C	91,15 ± 1,45	98,00 ± 0,59	96,50
Filet 100° C	89,36 ± 2,42	95,54 ± 2,70	94,10
Ganz Gt	90,29 ± 1,02	94,98 ± 0,83	97,34
Ganz 40° C	89,07 ± 1,97	96,28 ± 1,20	96,60
Ganz 70° C	90,97 ± 1,45	96,50 ± 1,93	96,50
Ganz 100° C	90,33 ± 0,75	96,17 ± 0,33	95,40
Abfall Gt	88,84 ± 0,74	94,66 ± 0,75	96,40
Abfall 40° C	88,05 ± 1,19	93,39 ± 1,07	95,30
Abfall 70° C	90,21 ± 0,77	96,32 ± 0,87	95,10
Abfall 100° C	86,20 ± 3,56	92,63 ± 3,31	94,90

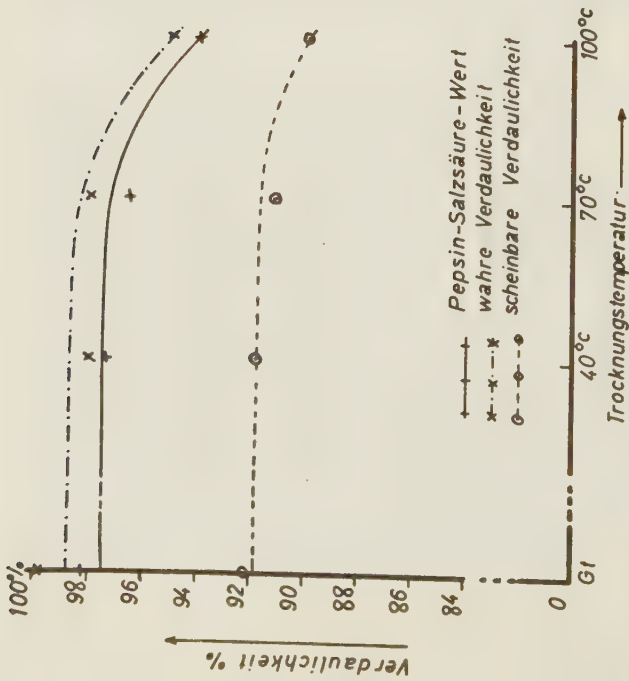


Abb. D 1 Einfluß der Trocknungstemperatur auf die Verdaulichkeit in vitro und in vivo im Filetmehl.

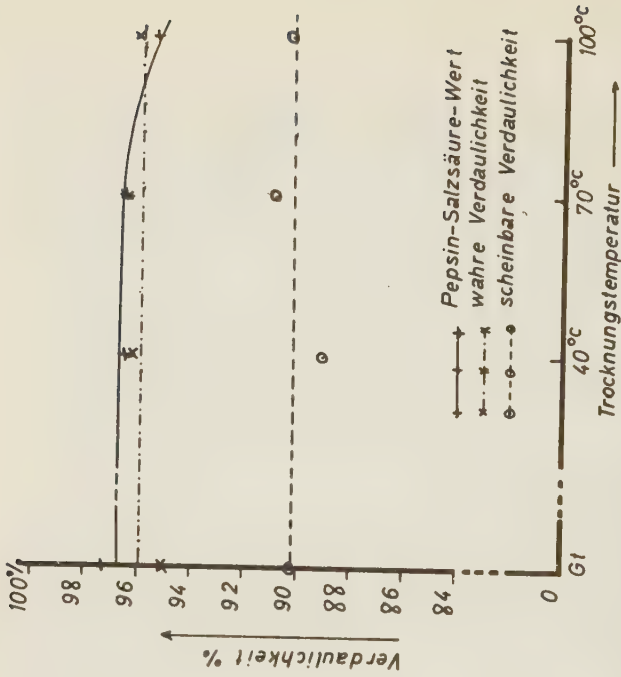


Abb. D 2 Einfluß der Trocknungstemperatur auf die Verdaulichkeit in vitro und in vivo im Ganzfischmehl.

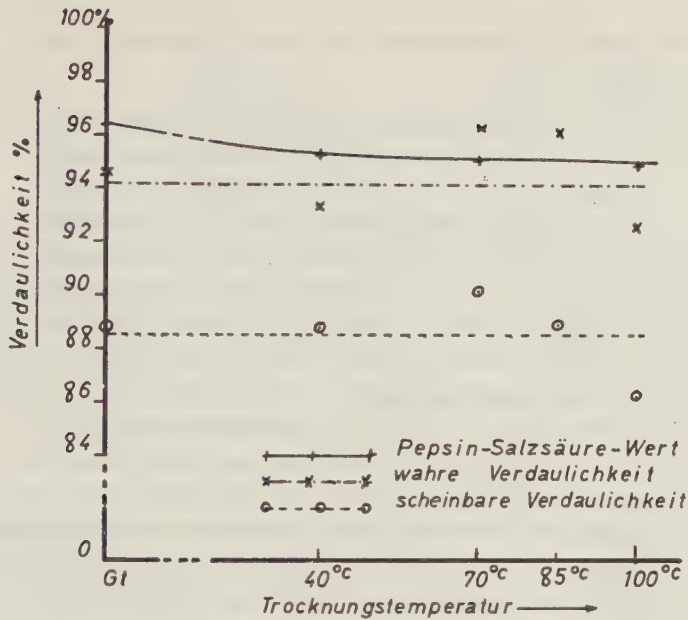


Abb. D 3 Einfluß der Trocknungstemperatur auf die Verdaulichkeit *in vitro* und *in vivo* im Abfallmehl.

Aus dieser Gegenüberstellung kann folgendes festgestellt werden:

- a) Bei den "Filetmehlen" stimmen die Pepsin-Salzsäure-Werte mit den wahren Verdaulichkeitskoeffizienten (wV) recht gut überein. Die kritische Trocknungstemperatur liegt hier zwischen 40°C und 70°C . Bei Erhöhung der Trocknungstemperatur auf 100°C ist eine deutliche Abnahme der Verdaulichkeit sowohl "in vitro" als auch "in vivo" festzustellen (vergl hierzu Abb. D 1).
- b) Bei den "Ganzfischmehlen" liegen die Verhältnisse etwas anders. Die Pepsin-Salzsäure-Werte weisen zwar mit der Erhöhung der Trocknungstemperatur eine kleine abfallende Tendenz auf, die "scheinbaren"- (sV) und die "wahren" Verdaulichkeitskoeffizienten (wV) hingegen werden hier durch Temperaturen bis 100°C nicht ungünstig beeinflusst (vergl. hierzu Abb. D 2).
- c) Die Betrachtung der Ergebnisse bei den "Abfallmehlen" ergibt, daß die Pepsin-Salzsäure-Werte im Bereich der "wV" liegen. Beide Werte zeigen nahezu die gleiche Tendenz (keinen schädigenden Einfluß der Trocknungstemperatur bis 100°C - vergl. hierzu Abb. D 3).

Aus diesen Ergebnissen geht auch hervor, daß die Pepsin-Salzsäure-Werte bedeutend näher bei den "wahren" als bei den "scheinbaren" Verdaulichkeitskoeffizienten liegen und zwar bei allen drei Fischmehlssorten (Filet-, Ganzfisch-, Abfallmehle). Die Regressions- und die Korrelationsanalyse ergaben jedoch keine ausreichend statistisch gesicherte Abhängigkeit (vergl. Hierzu Abb. D 4 und Abb. D 5);

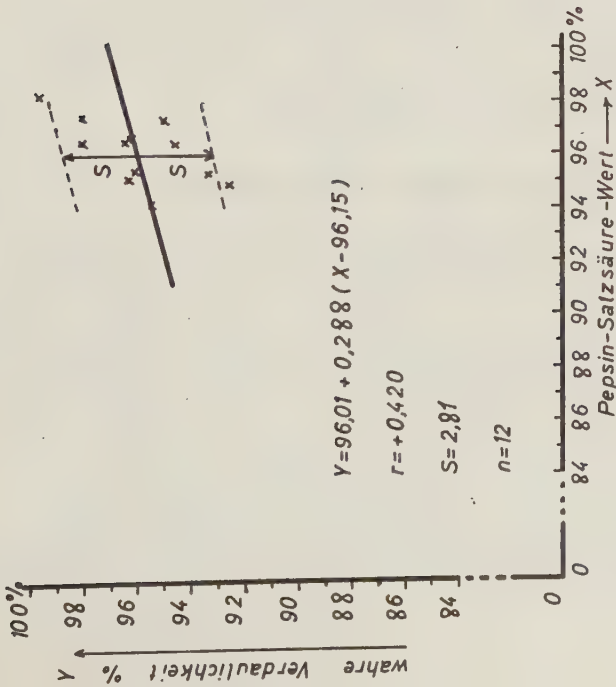


Abb. D 4 Der Zusammenhang zwischen der wahren Verdaulichkeit und dem Pepsin-Salzsäure-Wert

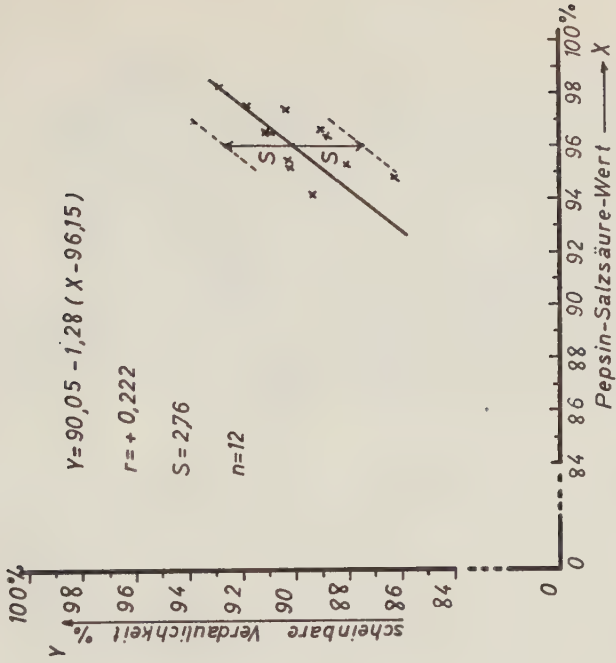


Abb. D 5 Der Zusammenhang zwischen der scheinbaren Verdaulichkeit und dem Pepsin-Salzsäure-Wert

Danach betragen die Korrelationskoeffizienten:

$$r_{\text{peps./wV}} = + 0,420 \quad r_{\text{peps./sV}} = + 0,222$$

(r bzw. t muß jedoch mindestens $\pm 0,580$ betragen, wenn es eine statistisch gesicherte Abhängigkeit gäbe. [Vergl hierzu Weber (1964)])

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß die Frage der Übereinstimmung der "in vivo" mit der "in vitro" bestimmten Verdaulichkeit noch nicht mit letzter Exaktheit beantwortet werden kann.

2. Vergleich der chemischen Bewertung durch Bestimmung von "verfügbarem Lysin" und Tryptophan mit den biologischen Bewertungsmaßstäben BW und N-Bilanz %

Bei einer Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den chemischen und biologischen Untersuchungen der drei Fischmehlsorten Filet-, Ganzfisch-, und Abfallmehl kann folgendes festgestellt werden:

2.1. Gehalt an "verfügbarem Lysin" und die BW:

Aus der Abb. D 6 geht hervor, daß mit steigendem Gehalt an "verfügbarem Lysin" auch die BW zunimmt. Zwischen den Aussagen dieser beiden Methoden liegt also ein linearer Zusammenhang. Dieser ist wie folgt statistisch gesichert: ($P < 0,01$) Nach der Korrelationsanalyse beträgt $r = + 0,990$, die Zufallsgrenze soll mindestens $\pm 0,690$ betragen.

Weiterhin ergibt sich aus Tabelle D 2, daß das Verhältnis BW / "verfügbarem Lysin" stets einen konstanten Faktor ($F = 11,33 \pm 0,23$) bildet, mit einem Variationskoeffizienten von $\pm 2 \%$.

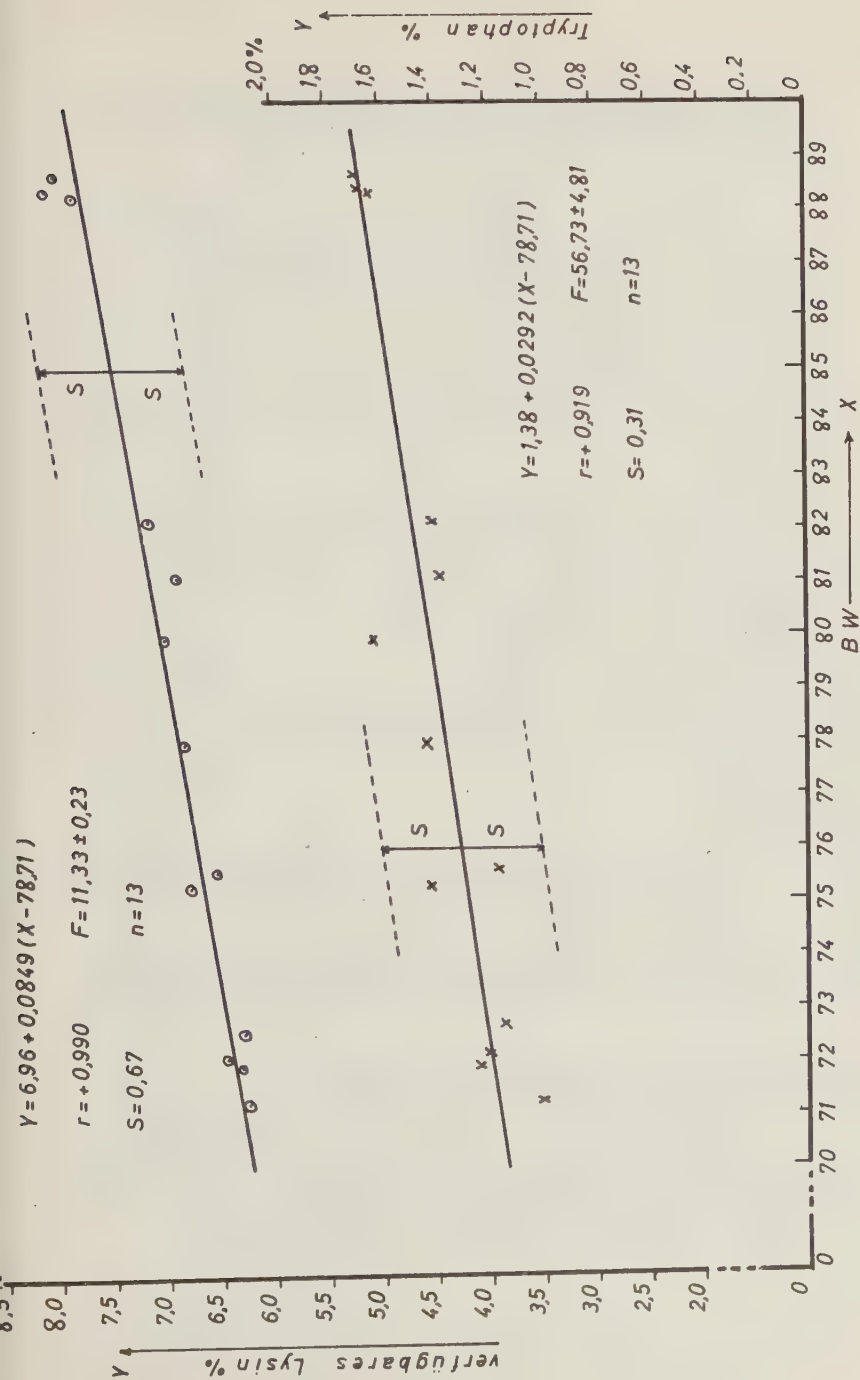


Abb. D 6 Der Zusammenhang zwischen verfügbarem Lysin, Tryptophan und der BW

Tab. D 2: Berechnung der BW aus dem "verfügbaren Lysin"

$$BW = v. \text{ Lys } \cdot 11,33$$

	B W	verfü- bares Lysin	Fi	$\bar{F} \pm s$	berech- nete B W	Diff.
Filet Gt	88,65	8,00	11,08		90,64	+1,99
Filet 40°C	88,39	8,08	10,94		91,54	+3,15
Filet 70°C	88,23	7,85	11,23		88,94	+0,71
Filet 100°C	79,92	7,03	11,37		79,64	-0,28
Ganz Gt	82,15	7,18	11,44		81,35	+1,20
Ganz 40°C	81,11	6,89	11,77	11,33 $\pm$ 0,23	78,06	-3,05
Ganz 70°C	77,98	6,87	11,35		77,83	-0,15
Ganz 100°C	75,29	6,78	11,10		76,81	+1,52
Abfall Gt	75,59	6,54	11,55		74,09	-1,50
Abfall 40°C	72,67	6,28	11,57		71,15	-1,52
Abfall 70°C	72,17	6,46	11,17		73,19	+1,02
Abfall 100°C	71,94	6,32	11,38		71,60	-0,34
Fischmehl X Probe aus der Praxis (FMX)	71,25	6,25	-	-	70,82	-0,43

Aus dem Gehalt an "verfügbarem Lysin" und dem o.g. Faktor wurde die BW rechnerisch ermittelt.

Wie aus der Tabelle zu ersehen, stimmen die berechneten mit den im Tierversuch bestimmten Daten gut überein.

2.2. Gehalt an Tryptophan und die BW

Nach Abbildung D 6 ist, wie beim "verfügbaren Lysin", auch mit steigendem Gehalt an Tryptophan eine Zunahme der BW zu beobachten.

Diese Abhängigkeit ist statistisch gesichert ($P < 0,01$). Nach der Korrelationsanalyse ist $r = + 0,919$, der Zufallsgrenzwert soll mindestens $\pm 0,690$ betragen.

Der entsprechende Faktor aus dem Verhältnis BW zum Gehalt an Tryptophan beträgt $56,73 \pm 4,81$ mit einem Variationskoeffizienten von $\pm 8,5 \%$. Die mit Hilfe dieses Faktors rechnerisch ermittelten BW-Werte weichen allerdings, wie Tabelle D 3 zeigt, z. T. erheblich von den im Tierversuch bestimmten BW-Werten ab.

Tab D 3: Berechnung der BW aus dem Tryptophan

	B W	Tryp- to- phan	Fi	$\bar{F} \pm s$	berech- nete B W	Diff.
Filet Gt	88,65	1,68	52,79	$56,73 \pm 4,81$	95,01	+6,56
Filet 40°C	88,39	1,67	52,92		94,74	+6,35
Filet 70°C	88,23	1,63	54,12		92,47	+4,24
Filet 100°C	79,92	1,63	49,03		92,47	+12,47
Ganz Gt	82,15	1,40	58,67		79,42	-2,73
Ganz 40°C	81,11	1,38	58,77		78,28	-2,83
Ganz 70°C	77,98	1,43	54,53		81,11	+3,13
Ganz 100°C	75,29	1,42	53,02		80,55	+5,26
Abfall Gt	75,59	1,16	65,16		65,80	-9,79
Abfall 40°C	72,67	1,14	63,68		64,67	-8,00
Abfall 70°C	72,17	1,20	60,14		68,23	-3,94
Abfall 100°C	71,94	1,24	58,01		70,33	-1,61
FM X	71,25	1,03	-	-	58,43	-12,82

Eine Ursache für diese Abweichung ist die bei den Trocknungsversuchen festgestellte Hitzestabilität des Tryptophans. Während die BW mit zunehmender Erhitzung abnimmt, bleibt der Gehalt an Tryptophan unverändert.

2.3. Gehalt an "verfügbarem Lysin" und die N-Bilanz %

Wie aus Abb. D 7 hervorgeht, besteht zwischen dem Gehalt an "verfügbarem Lysin" und der entsprechenden N-Bilanz % wiederum ein linearer Zusammenhang. Der Grad dieses Zusammenhanges ist statistisch gesichert, da $r = + 0,941$, während nach dem T-Test $t_{0,01,11} = \pm 0,69$ als Zufallshöchstgrenze erforderlich ist.

Berechnung der N-Bilanz % aus dem "verfügbaren Lysin"

Tab. D 4: N - bilanz % = v. Lys . 8,06

	N-Bilanz %	verfügbares Lysin	Fila/b	$\bar{F} \pm s$	berechnete % N-Bilanz	Diff.
Filet Gt	66,5	8,00	8,31	$8,06 \pm 0,37$	64,5	- 2,0
Filet 40°C	68,5	8,08	8,47		65,1	- 3,4
Filet 70°C	65,0	7,85	8,28		63,4	- 1,6
Filet 100°C	56,6	7,03	8,05		56,6	0,0
Ganz Gt	59,0	7,18	8,21		57,9	- 1,1
Ganz 40°C	60,5	6,89	8,78		55,5	- 5,0
Ganz 70°C	54,4	6,87	7,92		55,3	+ 0,9
Ganz 100°C	52,8	6,78	7,78		54,6	+ 1,8
Abfall Gt	53,8	6,54	8,22		52,7	- 1,1
Abfall 40°C	49,8	6,28	7,93		50,6	+ 0,8
Abfall 70°C	50,3	6,46	7,78		52,0	+ 1,7
Abfall 100°C	46,5	6,32	7,35		50,9	+ 4,4
FM X	49,1	6,25	-	-	50,3	+ 1,2

Aus Tabelle D 4 ist weiterhin ersichtlich, daß das Verhältnis N-Bilanz / "verfügbares Lysin" stets den konstanten Faktor $8,06 \pm 0,37$ mit einem Variationskoeffizienten von $\pm 4,58$ % ergibt. Mit dem Gehalt an "verfügbarem Lysin" und diesem Faktor wurde die N-Bilanz % rechnerisch ermittelt.

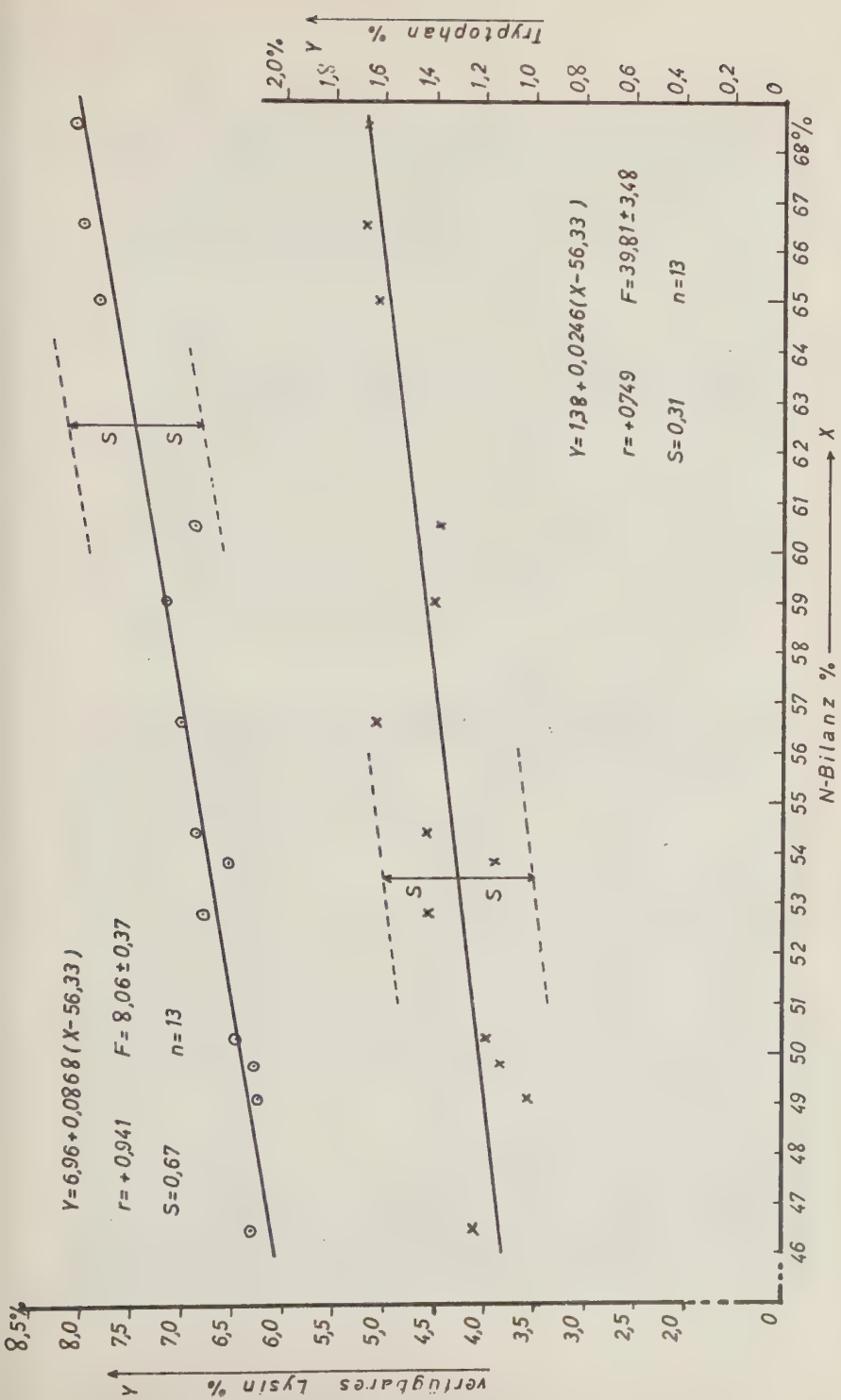


Abb. D7 Der Zusammenhang zwischen verfügbarem Lysin, Tryptophan und N-Bilanz%

Wie aus der Tabelle zu entnehmen, stimmen die berechneten Daten mit den im Tierversuch bestimmten N-Bilanz %-Werten gut überein. Der Variationskoeffizient dieses Faktors ist zwar breiter als der der BW, liefert aber ein befriedigendes Ergebnis.

2.4. Der Gehalt an Tryptophan und die N-Bilanz %

Ähnlich wurde versucht, einen Faktor mit dem Gehalt an Tryptophan zu ermitteln. Obwohl zwischen dem Gehalt an Tryptophan und der N-Bilanz % ein statistisch gesicherter Zusammenhang gefunden worden ist, (da $r = + 0,749$, $t 0,01$, 11 mindestens $\pm 0,690$ als Zufallshöchstwert betragen soll), eignet sich der Gehalt an Tryptophan weniger als der an "verfügbarem Lysin" dafür, die N-Bilanz rechnerisch zu ermitteln.

Tab. D 5: Berechnung der N-Bilanz % aus dem Tryptophan

	N-Bilanz %	Tryptophan	Fi	$\bar{F} \pm s$	berechnete % N-Bilanz	Diff.
Filet Gt	66,5	1,68	39,58	39,81 $\pm$ 3,48	66,8	+ 0,3
Filet 40°C	68,5	1,67	41,01		66,4	- 2,1
Filet 70°C	65,0	1,63	40,81		64,9	- 0,1
Filet 100°C	56,6	1,63	34,72		64,9	+ 8,3
Ganz Gt	59,0	1,40	42,14		55,7	- 3,3
Ganz 40°C	60,5	1,38	34,82		54,9	- 5,6
Ganz 70°C	54,4	1,43	38,04		56,9	+ 2,5
Ganz 100°C	52,8	1,42	37,18		56,5	+ 3,7
Abfall Gt	53,8	1,16	46,38		46,2	- 7,6
Abfall 40°C	49,8	1,14	43,68		45,3	- 4,5
Abfall 70°C	50,3	1,20	41,91		47,7	- 2,6
Abfall 100°C	46,5	1,24	37,50		49,3	+ 2,8
FM X	49,1	1,03	-	-	41,0	- 8,1

Wie aus Tabelle D 5 ersichtlich, beträgt der Faktor $39,81 \pm 3,48$ mit einem Variationskoeffizienten von $\pm 8,75$. Die Differenzen zwischen den berechneten und den im Tierversuch erhaltenen Daten sind folglich zu hoch, um diese Berechnungsformel verwenden zu können.

Zusammenfassend ist folgendes festzustellen:

- 1) Das "verfügbare Lysin" stimmt mit den biologischen Bewertungsmaßstäben BW und N-Bilanz % besser überein, als das Tryptophan.
- 2) Das "verfügbare Lysin" stimmt mit der BW besser als mit der N-Bilanz überein.
- 3) Das "verfügbare Lysin" eignet sich aufgrund dieser Ergebnisse dazu, den biologischen Wert der untersuchten Fischmehle rechnerisch zu ermitteln, und zwar nach den folgenden Formeln:

$$B\ W = v.\ Lys. \times 11,33$$

$$N\text{-Bilanz \%} = v.\ Lys. \times 8,03$$

"v. Lys." = der Gehalt an "verfügbarem Lysin".

Die angegebenen Formeln können allerdings nur für die Berechnung des biologischen Werts des Kabeljau - Proteins verwendet werden.

Auf andere Proteine oder auch Fischarten lassen sie sich allerdings nicht ohne weiteres übertragen. Der biologische Wert eines Nahrungs- bzw. Futtermittels ist nämlich nicht allein von dem absoluten Gehalt seiner Aminosäuren abhängig. Andere Faktoren, wie die Verhältnisse der Aminosäuren zueinander (Aminosäuren-Gleichgewicht), die Zusammensetzung des Proteins bzw. der Gehalt an Begleitstoffen, wie Fett und Mineralstoffe, spielen keine unwesentliche Rolle bei der Verwertung des Proteins im Körper.

Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den Literaturangaben: B u n y a n und P r i c e (1960) haben im Walfleischmehl einen Zusammenhang zwischen

dem Gehalt an "verfügbarem Lysin" und der BW feststellen können. Sie gaben folgende Formel für die Berechnung des biologischen Wertes an:

$$y = 7,52 \cdot x + 4$$

y = BW

x = der Gehalt an "verfügbarem Lysin"

Das ist eine Bestätigung dafür, daß die BW eines Fischmehls direkt von dem Gehalt an seinem "verfügbaren Lysin" abhängig sein kann. Der entsprechende Berechnungsfaktor ist jedoch für jedes Fischprotein verschieden.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von C a r p e n t e r und E l l i n g e r (1955) überein und ergänzen sie noch. Sie haben den GPV (Gross Protein Value) im Kükenversuch mittels des Gehaltes an "verfügbarem Lysin" mit einer Genauigkeit von $\pm 5\%$ ermitteln können. O s t e r h a u t et al. (1959) haben eine Methode ausgearbeitet, mit der die Verfügbarkeit der Aminosäuren (darunter das Lysin) bestimmt werden kann (chicks bioassay method). Mittels der täglichen Gewichtszunahme konnten sie den Gehalt an "verfügbarem Lysin" einer Fischmehl-futtermischung mit einer Genauigkeit von $\pm 0,4\%$ berechnen.

C a r p e n t e r et al. (1957) haben festgestellt, daß bei einem handelsüblich in England hergestellten Fischmehl (1. Phase: Vakuumtrocknung bei 54°C , 2. Phase: Dampftrocknung bei 93°C) der GPV und das "verfügbare Lysin" im Vergleich zu der Kontrolle (Vakuumtrocknung bei 60°C) niedriger lagen. Dieser GPV-Abfall konnte durch eine Zugabe von Lysin-hydrochlorid behoben werden. Dagegen war bei der Anwendung von feuchter Hitze (Trocknung bei 105°C und 95% Luftfeuchtigkeit, Bedingungen, die in der Praxis kaum vorkommen) die GPV-Abnahme durch Lysin-hydrochlorid-

Zugabe nicht zu beheben. Demzufolge vermuten sie, daß neben dem "verfügbaren Lysin" wahrscheinlich auch Cystin und Methionin für den biologischen Wert eines Fischmehls in Betracht komme. O s t e r - h a u t et al. (1959) haben feststellen können, daß der Gehalt an Cystin und Methionin eine bessere Übereinstimmung mit dem biologischen Wert ergibt als der Gehalt an Methionin allein.

Unter Berücksichtigung der eigenen Ergebnisse und der Ergebnisse o. g. Autoren kann das "verfügbare Lysin" also als ein "wertbestimmender Faktor", d. h. als ein Qualitätsindikator für den biologischen Wert des Fischproteins bezeichnet werden.

Den wertbestimmenden Faktor eines Proteins kann eine bestimmte essentielle Aminosäure oder ein Anteil einer essentiellen Aminosäure - wie z. B. das "verfügbare Lysin" - darstellen oder eine Kombination von einer essentiellen und einer nicht essentiellen Aminosäure, wie z. B. die Kombination "Methionin und Cystin", in der sich die biologische Qualität und die biologischen Qualitätsveränderungen widerspiegeln. Dabei ist zu bemerken, daß die Eignung der einzelnen essentiellen und nicht essentiellen Aminosäuren, um als ein wertbestimmender Faktor bezeichnet werden zu dürfen, sehr unterschiedlich sein kann. Es genügt nicht, daß diejenige Aminosäure zu den essentiellen Aminosäuren zählt, um den biologischen Wert eines Proteins auf chemischem Wege rechnerisch zu ermitteln. Ein Beispiel dafür kann anhand der eigenen Untersuchungen gezeigt werden. Das Tryptophan z. B. zählt zu den ersten limitierenden, essentiellen Aminosäuren des Fischproteins, und trotzdem eignet es sich nicht so gut wie das "verfügbare Lysin", um den biologischen Wert des Fischproteins rechnerisch zu ermitteln. Nach R a m a R a o (1959) beträgt der tägliche Bedarf der wachsenden Ratte an

Tryptophan 0,11 % der Futtermischung (mit 10 % RP) pro Tier und Tag. Diese Bedarfszahl liegt gerade unter dem in dieser Arbeit festgestellten Gehalt an Tryptophan im Protein der Fischabfälle, so daß auch hier der tägliche Bedarf der Ratte an Tryptophan gewährleistet ist.

Dieses Beispiel erklärt, warum manchmal keine gute Übereinstimmung zwischen dem "chemical score" bzw. dem EAS-Index und der biologischen Wertigkeit gefunden werden konnte. Stattdessen kann in dieser Hinsicht die Erfassung des wertbestimmenden Faktors vorgeschlagen werden. Die verschiedenen Proteine müssen hier allerdings als eine heterogene Gruppe aufgefaßt werden. Es empfiehlt sich, diesen wertbestimmenden Faktor für jedes Protein ausfindig zu machen.

Wie in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt werden konnte, kann mit Hilfe des "verfügbaren Lysins" der biologische Wert des Kabeljau-Fischmehls auf chemischem Weg ermittelt werden. Das "verfügbare Lysin" kann also als wertbestimmender Faktor angesehen werden, da sich in ihm die biologische Qualität und die biologischen Qualitätsveränderungen widerspiegeln.

3. Die Aminosäuren Glycin und Hydroxyprolin und ihre Aussagekraft für die Bewertung der Qualität und Herkunft von Fischmehlen

Wie aus den Ergebnissen der chemisch-analytischen Bestimmungen der Aminosäuren hervorgeht, ist es durch die Bestimmung des "verfügbaren Lysins" allein nicht möglich, etwas über die Herkunft von Fischmehlen auszusagen, weil es gegen Temperatureinflüsse empfindlich ist. Wegen seines niedrigen Gehaltes an "verfügbarem Lysin" muß ein Fischmehl z. B. nicht aus einem geringwertigen Material hergestellt sein. Sein ursprünglich u. U. höherer Gehalt an "verfügbarem Lysin" kann auch durch den Einfluß der Trocknungstemperatur herabgesetzt worden sein. Z. B. weist bei 100° C getrocknetes Filetmehl praktisch den gleichen Gehalt an "verfügbarem Lysin" auf wie das gefriergetrocknete Ganzfischmehl. (Vergl. Tabelle C 8).

Ähnlich verhalten sich auch die biologischen Bewertungsmaßstäbe BW oder die N-Bilanz %, da sie gegenüber der Hitzebehandlung labil sind. Z. B. ist es mit Hilfe der BW oder der N-Bilanz % nicht möglich, zwischen Filetmehl (100° C) und Ganzfisch (Gt) bzw. zwischen Ganzfisch (100° C) und Abfallmehl (Gt) qualitätsmäßig zu unterscheiden, oder Aussagen über die Herkunft der Fischmehle zu machen (Vergl. Tabelle B 11).

Das Tryptophan eignet sich wegen seiner Hitzestabilität zwar besser als das "verfügbare Lysin" bzw. BW oder N-Bilanz %. Die Unterschiede zwischen den Tryptophan-Gehalten in den Filet-, Ganzfisch- bzw. Abfallmehlen sind allerdings relativ gering

(etwa 1 : 0,8 : 0,7 , Vergl. hierzu Tabelle C 5). Dagegen erscheinen sowohl das Glycin als auch das Hydroxyprolin in dieser Hinsicht wesentlich besser geeignet, und zwar aus folgenden Gründen:

- a) Diese Aminosäuren sind weitgehend gegen Temperatureinflüsse stabil.
- b) A n t o n a c o p o u l o s (1957) hat außerdem festgestellt, daß Glycin und Hydroxyprolin auch in verdorbenem Fleisch weitgehend unverändert bleiben.
- c) Die Gehalte zwischen Filet-, Ganzfisch- und Abfallmehlen unterscheiden sich ganz wesentlich voneinander: Im Falle des Glycins verhalten sich die Gehalte etwa wie 1 : 4 : 6 ; im Falle des Hydroxyprolins beträgt das entsprechende Verhältnis zwischen den drei Mehlen etwa 1 : 4 : 7 (Vergl. hierzu Tabelle C 11). Diese Unterschiede liegen außerhalb jeder analytischen Fehlergrenze.

Aufgrund dieser Gegebenheiten erscheint es durch die Bestimmung des Glycins oder des Hydroxyprolins möglich, selbst über die Zusammensetzung und Herkunft von Fischmehlen Aussagen zu machen und die Ergebnisse der biologischen Bewertung damit wesentlich zu ergänzen.

Wenn z. B. ein Fischmehl "in vivo" (BW, N-Bilanz %) oder "in vitro" (verfügbares Lysin) einen niedrigen biologischen Wert aufweist, kann dieser sowohl durch unsachgemäße Verarbeitung (zu hohe Trocknungstemperatur) verursacht worden sein, als auch durch Zusätze von Abfällen. Mit Hilfe dieser Methoden kann also nur der biologische Wertzustand festgestellt werden. Durch zusätzliche Bestimmung von Glycin oder Hydroxyprolin können Rückschlüsse nicht nur auf die Wertigkeit, sondern auch auf die Ursache einer evtl Erniedrigung gezogen werden:

Unsachgemäße Verarbeitung bei niedrigen Werten an "verfügbarem Lysin" und Glycin bzw. Hydroxyprolin. Erniedrigtes "verfügbares Lysin" und gleichzeitig erhöhte Glycin/Hydroxyprolinwerte deuten auf höhere Zusätze von Fischabfällen hin.

Beispiele aus eigenen Untersuchungen:

- a) Filetmehl, bei 100° C getrocknet, und Ganzfischmehl, gefriergetrocknet (Gt) haben in etwa den gleichen biologischen Wert:
BW = 80 ; "verfügbares Lysin" = 7 % .
Gehalte an Glycin: 1,1 % (Filet); 4,4 % (Ganzfisch)
an Hydroxyprolin: 0,3 % (Filet); 1,4 % (Ganzfisch)
- b) Vergleichbar liegen auch die Verhältnisse z. B. zwischen Ganzfischmehl, bei 100° C getrocknet und Abfallmehl (Gt):
BW = 75 ; "verfügbares Lysin" = 6,6 %
Glycin: 4,3 % (Ganzfisch); 6,6 % (Abfall)
Hydroxyprolin: 1,4 % (Ganzfisch); 2,1 % (Abfall)

Nur durch die zusätzliche Bestimmung von Glycin/Hydroxyprolin ist also die unterschiedliche Herkunft bzw. die Ursachen der Wertminderung deutlich zu erkennen.

4. Der Gehalt an extrahierbarem bzw. polymerisiertem Fett und der BW

Es ist bekannt, daß ein hoher Fettgehalt im allgemeinen die biologische Wertigkeit eines Fischmehls negativ beeinflussen kann. Allardyce et al. (1933) Wichtiger als der absolute Fettgehalt sind nach March (1962) seine chemische Zusammensetzung bzw. seine spezifischen Kennzahlen. Durch die Hitzebehandlung bzw. die Trocknung wird ein Teil des Fettes oxydiert, dabei bilden sich hochmolekulare, in Äther unlösliche Verbindungen (polymerisiertes Fett).

Die Frage, ob die Anhäufung dieses polymerisierten Fettes einen Einfluß auf die BW des Fischmehls hat, kann hier nur am Rande behandelt werden, da spezielle Untersuchungen in dieser Hinsicht außerhalb des Rahmens der vorliegenden Arbeit liegen.

Als Kriterium für die Bildung des polymerisierten Fettes wurde die Abnahme des durch Äther extrahierbaren Fettes (freies Fett) angesehen, da, wie in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde, der Gehalt an Gesamtfett durch die Trocknungstemperatur nicht beeinträchtigt wird (vgl. Abb. A 3).

Aus Abbildung D 8 geht hervor, daß im allgemeinen die Abnahme des Ätherextraktes durch die Trocknungstemperatur mit der Erniedrigung der BW des Fischmehls parallel gehen kann. Dieser Zusammenhang kann allerdings von der Art des Fettes (aus Filet, Abfall usw.) bzw. seiner Zusammensetzung (vor allem Verhältnis von freiem Fett/Gesamtfett) abhängig sein. Z. B. enthält "Filet 70° C" praktisch ebensoviel Ätherextrakt wie "Filet 100° C". Beide Proben weisen jedoch in ihrer BW einen großen Unterschied auf.

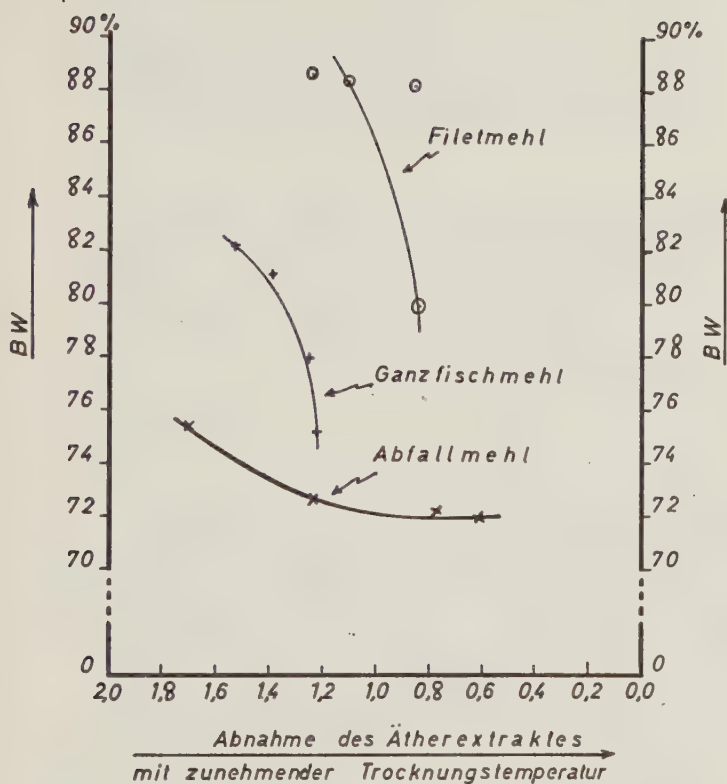


Abb. D 8 Der Zusammenhang zwischen der Abnahme des Ätherextraktes ("freies Fett"-damit Zunahme des sogen. polymerisierten Fetts im Gesamtfett) und der BW der Fischmehle.

Dagegen enthält der bei 100° C getrocknete Abfall nur 1/3 des Ätherextraktes, der beim gefriergetrockneten Abfall gefunden wurde, obgleich der Unterschied in ihrer BW nur gering ist (3%). Daraus läßt sich schließen, daß bei diesen beiden Fischmehlsorten (Filet und Abfall) die evtl. Anhäufung von polymerisiertem Fett wenig Einfluß auf ihre BW hat.

Beim Ganzfisch liegen die Verhältnisse etwas anders, da die evtl. Beziehungen zwischen dem polymerisierten Fett und der BW deutlicher sind und beide Merkmale parallel miteinander gehen. Die Abnahme (in ihrer Kurve) ist viel steiler und gleichmäßiger als bei den anderen Fischmehlsorten.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß der Anhäufungsgrad des polymerisierten Fettes nicht immer mit einer parallelen Verschlechterung der BW verbunden ist. Wichtiger in diesem Zusammenhang kann die Art des beim Oxydationsvorgang entstehenden Endproduktes sein. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von J o h n s o n et al. (1957) überein. Er hat z. B. feststellen können, daß das thermisch oxydierte Maisöl mehr das Wachstum der Ratte beeinträchtigt, als das thermisch oxydierte Butterfett.

E Z u s a m m e n f a s s u n g

=====

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Vergleich biologischer und chemischer Bewertungsmaßstäbe bei der Qualitätsbeurteilung von Fischproteinen. Insbesondere wird der Einfluß steigender Trocknungstemperaturen auf den biologischen Wert untersucht.

Als Untersuchungsobjekt dient der Kabeljau (gadus morhua). Die Fische wurden, im Sinne der Verarbeitung in der Praxis, in 3 Gruppen aufgeteilt:

Filet , Ganzfisch , Abfall

Diese 3 Gruppen wurden folgenden Trocknungsbedingungen unterworfen:

- 1) Gefriertrocknung; 2) Vakuumtrocknung bei 40°C;
3) Trocknung bei 70° C ; 4) Trocknung bei 100° C.

Die chemische Analyse des Ausgangsmaterials (3 Gruppen) und des jeweiligen Trockenguts (12 Proben) zeigte u. a., daß z.B. das Ca : P Verhältnis in den drei Fischmehlsorten recht unterschiedlich ist:

Filetmehl = 0,2 : 1 ; Ganzfischmehl = 1,1 : 1 ;
Abfallmehl = 1,4 : 1

Für die Fütterungsversuche wurden die Filet- und Ganzfischmehle durch Zusätze von CaCO_3 und CaHPO_4 auf das Ca : P der Abfallmehle (1,4 : 1) eingestellt, um einheitliche Bedingungen für die Proteinbewertung herzustellen.

Für die biologische Bewertung "in vivo" (Rattenversuch) wurden folgende Methoden verwendet:

Feststellung der Gewichtszunahme durch ΔG und PER (protein efficiency ratio); die biologische Wertigkeit BW (Thomas-Mitchell-Methode) ; die Verdaulichkeit; die N-Bilanz % ; und die NPU (net protein utilization).

Für die Berechnung der BW wurden das sogen. DVN (Darmverlust-N) und NEB (N-Erhaltungsbedarf) in einem N-freien Versuch ermittelt:

$$DVN = 0,1171 \cdot G ; \quad NEB = 0,3865 \cdot G \text{ mg N/Tier/Tag}$$

und bei der Auswertung berücksichtigt.

Bei den Untersuchungen über die Beeinflussung des biologischen Wertes durch die benutzten Trocknungstemperaturen (T) ist folgendes festgestellt worden:

- 1) Bei der Bestimmung der Gewichtszunahme durch ΔG und PER wurden weder bei den Filet- noch bei den Ganzfischmehlen ein negativer Einfluß von T festgestellt, wohl aber bei den Abfallmehlen ($P < 0,01$), die kritische T lag bei letzteren bei 70°C .

- 2) Durch die Bestimmung der BW und der wahren Verdaulichkeit (wV) ergab sich:

Im Fischmehl liegt die kritische T bei 70°C ($P < 0,01$), die Beeinflussung von BW und wV läuft dabei parallel. Das deutet darauf hin, daß der negative Einfluß der T sich sowohl auf biologisch aktive Gruppen des Proteins (ϵ -Gruppen des Lysins, SH-Gruppen etc.), als auch auf andere Eigenschaften der Proteine, wie z. B. deren Löslichkeit bzw. Verdaulichkeit, erstreckt.

Im Ganzfischmehl liegt nach der BW die kritische T bei 70°C ($P < 0,05$), hier fehlt jedoch die parallele Beeinflussung der Verdaulichkeit. Das deutet darauf hin, daß der negative Einfluß der T sich auf biologisch aktive Gruppen des Ganzfischproteins beschränkt.

Für das Abfallmehl liegt nach der BW die kritische T mehr bei 100°C ($P < 0,05$), ebenfalls ohne einen parallelen Einfluß auf die Verdaulichkeit.

- 3) Nach den N-Bilanz %-Daten befindet sich bei allen Fischmehlsorten (Filet-, Ganzfisch- und

Abfallmehle) die kritische T bei 70°C ($P < 0,01$). Die BW-Ergebnisse wurden also (mit Ausnahme der Abfallmehle) durch die N-Bilanz %-Daten bestätigt, letztere sind jedoch mit einem größeren Variationskoeffizienten verbunden.

- 4) Die NPU-Daten gehen mit den BW-Daten parallel. Die NPU (N-Ausnutzungsquote) läßt sich in NPU_m (für Erhaltung) und NPU_g (für Wachstum) unterteilen:

Nur mit Hilfe der Erfassung von NPU_m ist es möglich, Aussagen über den Erhaltungsbedarf eines Tieres von dem untersuchten Protein zu machen. Es hat sich bei gleicher Futteraufnahme gezeigt, daß NPU_m eine konstante Menge darstellt, die unabhängig ist von der Art bzw. dem biologischem Wert eines Fischmehls.

Aus den Ergebnissen geht weiter hervor, daß die NPU_g mit der N-Bilanz % identisch ist.

- 5) Der Zusammenhang zwischen NPU_g bzw. N-Bilanz % und PER ($r = + 0,772$) ist nach der Statistik enger als der Zusammenhang zwischen NPU_g bzw. N-Bilanz % und ΔG ($r = + 0,569$).

Die chemische Bewertung "in vitro" erfolgte durch Bestimmung der Verdaulichkeit (Pepsin-Salzsäure-Wert) und durch Bestimmung einiger charakteristischer Aminosäuren.

Für die positive Bewertung wurden das Tryptophan (2 Methoden) und das "verfügbare Lysin" nach Carpenter (1960) herangezogen. Für die negative Bewertung wurden das Glycin und das Hydroxyprolin nach Antonacopoulos (1957) verwendet.

Bei der Überprüfung der Tryptophan-Bestimmungsmethoden ergab sich, daß die Methode nach Winkler / Antonacopoulos (1963)

weniger durch die Konzentration des Tryptophans und die Proteinart beeinflusst wird als die Methode nach S p i e s - C h a m b e r s (1948).

Der Einfluß der Trocknungstemperatur (T) wirkte sich bei den 3 untersuchten Fischmehlen folgendermaßen auf ihren Gehalt an den 4 geprüften Aminosäuren aus:

- 1) Die Aminosäuren Tryptophan, Glycin und Hydroxyprolin werden - unabhängig von der Proteinart - nicht durch steigende T im gegebenen Bereich (bis 100° C) geschädigt; ihre Gehalte bleiben unverändert. Aufgrund ihrer Hitzestabilität eignen sie sich also nicht, den biologischen Wert eines Fischmehls "in vitro" zu bestimmen. Mit ihrer Hilfe lassen sich jedoch folgende Aussagen machen:
 - a) Sie erlauben einen Einblick in den Aufbau der Fischproteine, da sich gezeigt hat, daß diese drei Aminosäuren stets in einem konstanten Verhältnis zueinander stehen. Dieses Ergebnis fand in den Gewichtsverhältniszahlen (GVZ) und in den Molekularverhältniszahlen (MVZ) seinen Niederschlag.
 - b) Die Aminosäuren Glycin und Hydroxyprolin erlauben eine weitere wichtige Feststellung im Rahmen der Qualitätsbeurteilung von Fischmehlen: Mit ihnen sind Aussagen über die Herkunft der Fischproteine möglich, da die Gehalte dieser Bindegewebs-Aminosäuren vom Filet (1 % bzw. 0,3 %), über Ganzfisch (4,5 % bzw. 1,4 %) zu den Fischabfällen (6,5 % bzw. 2,1 %) sehr deutlich steigen.
- 2) Das "verfügbare Lysin" (v. Lys.) nimmt bei allen Fischmehlen mit steigender T ab und zeigt im

übrigen die gleiche Tendenz wie die biologischen Bewertungsmaßstäbe (BW, N-Bilanz %). Mit dem Gehalt an "verfügbarem Lysin" ist die Bestimmung der BW und der N-Bilanz % in vitro nach folgenden Formeln möglich:

$$\text{BW} = v. \text{Lys} \times 11,33 \quad r = + 0,990 \quad (P < 0,01)$$

$$\text{N-Bilanz \%} = v. \text{Lys} \times 8,03 \quad r = + 0,941 \quad (P < 0,01)$$

Die Frage der Übereinstimmung der Verdaulichkeit "in vitro" mit der "in vivo" läßt sich noch nicht mit letzter Exaktheit beantworten, obwohl die gefundenen Pepsin-Salzsäure-Werte bedeutend näher bei der wahren Verdaulichkeit liegen als bei der scheinbaren Verdaulichkeit.

Schlußfolgerung

Durch die biologische Bewertung kann die absolute Qualität eines Proteins für die Ernährung festgestellt werden.

Über die Ursachen einer geringeren Wertigkeit oder über die Zusammensetzung bzw. Herkunft von Fischproteinen vermag die biologische Bewertung allerdings nichts auszusagen.

Die biologischen Methoden können in bestimmten Fällen, wie sich hier am Beispiel der Fischmehle zeigen ließ, durch die Bestimmung einer oder mehrerer wertbestimmender Aminosäuren ersetzt werden. Um das allgemein durchführen zu können, müßten erst für jede Proteinart die wertbestimmenden Faktoren ermittelt werden.

Die chemischen Methoden können jedoch darüber hinaus die biologischen Methoden wesentlich ergänzen, da mit ihnen auch Aussagen über die Herkunft und Zusammensetzung von Proteinen möglich sind. Durch zusätzliche Bestimmung von Glycin und/oder Hydroxyprolin können auch Rückschlüsse über die Ursachen einer evtl. Abnahme des biologischen Wertes von Fischmehlen

(erniedrigte BW oder verfügbare Lysin-Werte) gezogen werden: Bei gleichzeitig niedrigen Glycin-Hydroxyprolin-Werten ist eine unsachgemäße Verarbeitung (zu hohe Erhitzung) als Ursache für den erniedrigten biologischen Wert anzusehen. Sind dagegen die Glycin-Hydroxyprolin-Werte erhöht, deutet das auf entsprechend hohe Zusätze von geringwertigen Proteinen (Fischabfälle) hin.

Für die allgemeine Beurteilung des biologischen Wertes anderer proteinreicher Futtermittel muß z.Zt. noch der Tierversuch zugrunde gelegt werden, da die Beurteilung mit Hilfe wertbestimmender Aminosäuren für viele Proteinarten noch nicht ausreichend untersucht ist.

Die chemischen Methoden können jedoch bereits jetzt, insbesondere für die Beurteilung von Fischmehlen in der Praxis, eine wertvolle Ergänzung und Bestätigung der biologischen Methoden darstellen.

F L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

=====

- | | | |
|---------------------|------|--|
| Albanese, A.A. u. | 1942 | J. Biol. Chem. <u>144</u> , 563 - |
| Frankston, J.F. : | | Zit. nach Höller, R. 1958. |
| Allardyce, W.J.; | 1933 | Poultry Sci, <u>12</u> , 163 - Zit. |
| Henderson, W. and | | nach March, B.E. in "Fish as |
| Asmundson, V.S.: | | Food II" S.383 (1962). Edited |
| | | by G. Borgstrom. Academie |
| | | Press, New York and London. |
| Almquist, H.J.: | 1956 | J. Agric. Food Chem. <u>4</u> . 638. |
| Ambrose, M.E. and | 1964 | Fish. News Intern. <u>3</u> , 210. |
| Snyder, D.G.: | | |
| Antonacopoulos, N.: | 1957 | Dissertationsarbeit, München. |
| Antonacopoulos, N.: | 1963 | Bundesforschungsanstalt für |
| | | Fischerei in Hamburg, |
| | | Jahres Bericht, S. C 68. |
| Antonacopoulos, N.: | 1964 | ebenda, S. C 73. |
| Bailey, K.: | 1957 | Biochem. Biophys. Acta, <u>24</u> , 612. |
| Barnes, R.H.; | 1946 | J. Nutr. <u>32</u> , 535. |
| Bates, M.J. and | | |
| Maack, J.E.: | | |
| Behm, G.: | 1955 | Archiv f. Tierern. <u>5</u> , 52. |
| Bender, A.E. and | 1957 | J. Nutr. <u>11</u> , 140. |
| Doell, B.H.: | | |
| Breirem, K.: | 1954 | Schriftenreihe zur Fütte- |
| | | rungslehre H. <u>14</u> , 5, 7. |
| Block, R.J. and | 1946 | Nutr. Abstr. Rev. <u>16</u> , 249. |
| Mitchell, H.H.: | | |
| Braude, R.: | 1961 | in "Fish in Nutrition" S.332: |
| | | FAO Intern. Congress; Washing- |
| | | ton, D.C. Edited by Heen, E. |
| | | and Kreuzer, R. (1962) - |
| | | Fishing News Books, London, |
| | | 110 Fleet St., E.C. 4. |

- | | | |
|--|-------------|---|
| Briskorn, C.H. und
Berg, H.W. | 1959 | Z. Lebensm. Unters. Forschg.
<u>109</u> , 302. |
| Brune, H. | 1963 | Persönliche Mitteilung |
| Brune, H. u.
Günther, K. | 1961 | Z. Tierphys. Tierern. u.
Futtermittelkd. <u>16</u> , 2, 97. |
| Bundesministerium
f. Ernährg.,
Landw. u. Forsten | 1963/
64 | Jahresbericht über die deut-
sche Fischwirtschaft. Verlag
Gebr. Mann, Berlin. |
| Bunyan, J. and
Price, S.A. | 1960 | J. Sci Food Agric. <u>11</u> , 25. |
| Becker, M. u.
Harnisch, S. | 1958 | Archiv f. Tierern. <u>8</u> , 309. |
| Boyne, A.W.;
Carpenter, K.J.
and Woodham, A.A. | 1961 | J. Sci Food Agric. <u>12</u> , 832. |
| Brüggemann, J.;
Drepper, K. u.
Drepper, G. | 1952 | Hoppe-Seyler's Z. <u>289</u> , 211:
Zit. nach Höller, R. 1958. |
| Carpenter, K.J.: | 1960 | Biochem. J. <u>77</u> , 604. |
| Carpenter, K.J.: | | Briefliche Mitteilung. |
| Carpenter, K.J.
and Ellinger, G.M.: | 1955 | Biochem. J. <u>61</u> , 11 P. |
| Carpenter, K.J.;
Ellinger, G.M. and
Shrimpton, D.H. | 1955 | J. Sci. Food Agric., <u>6</u> , 296. |
| Carpenter, K.J.;
Ellinger, G.M.
Munro, M.I. and
Rolfe, E.J. | 1957 | Brit. J. Nutr. <u>11</u> , 162. |
| Carpenter, K.J.
and Lea, C.H. | 1962 | in "Fish in Nutrition" S. 310. |
| Columbus, A.: | 1954a | Wiss. Abh. DAL-Berlin,
Bd. 5/2, 327 |

- | | | |
|---------------------|-------|--|
| Columbus, A.: | 1954b | Archiv f. Tierern. <u>4</u> , 51. |
| Columbus, A.; | 1959 | Archiv f. Tierern. <u>9</u> , 140. |
| Harnisch, W. u. | | |
| Scholz, F. | | |
| Connell, J.J. and | 1959 | J. Sci. Food Agric. <u>10</u> , 241. |
| Howgate, P.E. | | |
| Costa, G.: | 1960 | Nature, <u>188</u> , 549: Zit. nach
Kjaa, 1963. |
| Cremer, H.D.: | 1965 | 23. Diskustag. Forschbr.
Ernährind., 45. |
| Cutting, C.L.: | 1962 | in "Fish in Nutrition" S. 161. |
| DLG Nährwert Tab. | 1965 | |
| Dreosti, G.M.; | 1964 | Fish. News Intern. <u>3</u> , 314. |
| Wiechers, S.G. and | | |
| Conradie, W.J. | | |
| Dreze, A.: | 1956 | Bull. Soc. Chem. biol., <u>38</u> ,
243. Zit. nach Höller, R. 1958. |
| Duggan, D.E. and | 1956 | J. Biol. Chem. <u>223</u> , 313. |
| Udenfriend, S. | | |
| Dunn, M.S.; Camin, | 1949 | J. Nutr. <u>39</u> , 177. |
| M.N.; Eiduson, S. | | |
| and Malin, R.B. | | |
| Folin, O.: | 1905 | Am. J. Physiol. <u>13</u> , 117. |
| Geiger, E. and | 1962 | in "Fish as Food" II, S. 33. |
| Borgstrom, G. | | |
| Grau, C.R.; | 1959 | Comm. Fish. Rev. <u>21</u> , 8, S. 7. |
| Karrik, N.L.; | | |
| Lundholm, B.D. and | | |
| Barnes, R.N. | | |
| Greenhut, J.; | 1946 | J. Biol. Chem. <u>165</u> , 325. Zit.
nach Höller, R. 1958. |
| Schweigert, B.S. | | |
| and Elvehjem, C.A.: | | |

- | | | |
|---|------|---|
| Harrison,
and Hofmann, | 1961 | Biochem. J. <u>80</u> , 38. |
| Haurowitz, F.: | 1963 | "The Chemistry and Function
of Proteins", Acad. Press,
New York and London. |
| Heintze, K.: | 1955 | Z. Lebensm. Unters. Forschg.
<u>100</u> , 4, 253. |
| Heintze, K.: | 1955 | ebenda, <u>100</u> , 4, 463. |
| Heiss, R.: | 1950 | "Lebensmitteltechnologie" -
Verlag von J.F. Bergmann -
München. |
| Heiss, R.: | 1962 | "Fortschritte der Verfahrens-
technik in der Verpackungs-
und Lebensmittelindustrie"
P. Keppler Verlag, Baden-
Baden, Frankfurt/M.. |
| Henry, K.M. and
Kon, S.K. | 1950 | Biochem. Biophys. Acta <u>5</u> , 455. |
| Henry, K.M. and
Toothill, J. | 1960 | J. Sci. Food Agric. <u>11</u> , 576. |
| Higashi, H.: | 1962 | in "Fish in Nutrition" S. 125. |
| Höller, R.: | 1958 | Archiv f. Tierern. <u>8</u> , 182. |
| Hötzel, D.: | 1958 | Z. Tierphysiol., Tierern. u.
Futtermittelkd. <u>13</u> , 193. |
| Hubbel, C.H.: | 1961 | Feedstuffs, April, 42. |
| Johnson, O.C.;
Perkins, E.; Sugai,
M. and
Kummerow, F.A. | 1957 | J. Am. Oil Chemist's Soc.
<u>34</u> , 594. - Zit. nach
March, B.E. 1962. |
| Kofrányi, E.: | 1956 | Hoppe - Seyler's Ztschr.
physiol. Chem. <u>305</u> , 61. |
| Kofrányi, E.: | 1964 | ebenda, <u>335</u> , 161. |

- | | | |
|--------------------------------|------|--|
| Konosu, S. and
Matsuura, F. | 1962 | in "Fish in Nutrition" S. 260. |
| Koval'chuk, G.K.: | 1954 | Ukr. Biokhim Zh. <u>26</u> , 139, -
Zit. nach Lovern, 1965. |
| Krüger, R.: | 1949 | Helv. Chim. Acta <u>32</u> , 238:
Zit. nach Antonacopoulos, N.
1957. |
| Kühnau, J.: | 1949 | Angew. Chemie <u>61</u> , 357. |
| Kuiken, K.A.; | 1947 | J. Biol. Chem. <u>171</u> , 551: |
| Lyman, C.M. and | | Zit. nach Höller, R. 1958. |
| Hale, F. | | |
| Lahiry, N.L. and | 1955 | Food Research <u>21</u> , 87. |
| Proctor, B.E. | | |
| Lakesvela, B.: | 1958 | J. Agric. Sci. <u>51</u> , 164. |
| Lakesvela, B.: | 1961 | "Dietary amino acid Con-
stellation as a regulator of
herring Protein" - Bergen -
Oslo, Universtetforlaget. |
| Lea, C.H. and | 1950 | Biochem. Biophys. Acta <u>4</u> ,
518: Zit. nach Carpenter,
K.J. 1960. |
| Hannan, R.S. | | |
| Leroy, A.M.: | 1962 | in "Fish in Nutrition" S. 312. |
| Lyman, C.M. and | 1965 | J. A.O.A.C. <u>48</u> , 858. |
| Thomas, M.C.: | | |
| Lyman, C.M.; | 1956 | J. Agr. Food Chem. <u>4</u> , 1,008: |
| Kuiken, K.A. and | | Zit. nach March, B.E. 1962. |
| Hale, F. | | |
| Lovern, J.A.: | 1964 | Fish News Intern. <u>3</u> , 206, |
| Lovern, J.A.; | 1964 | ebenda, <u>3</u> , 310. |
| Olley, J. and | | |
| Parie, R. | | |
| Lovern, J.A.: | 1965 | J. A.O.A.C. <u>48</u> , 60. |

- | | | |
|---|-------------|---|
| Mac Foyden, D.: | 1945 | J. Biol. Chem. <u>158</u> , 107:
Zit. nach Antonacopoulos, N.
1957. |
| March, B.E.: | 1962 | in "Fish as Food II" S. 383.
Edited by G. Borgstrom,
Academic Press, New York and
London. |
| Martem'yanova, K.B.: | 1958 | in "Proceedings in Technol.
Fish Process" <u>35</u> , 161. Edited
by Makarova, T.I. - Food In-
dust. Publish. House, Moscow. |
| Messieu, G.H.;
Gruzman, J.;
Cravioto, R.O. and
Calvo, J. | 1949 | J. Nutr. <u>38</u> , 293. |
| Methodenbuch: | 1951 | Handbuch der Landwirt. Ver-
suchs- u. Untersuchungsmethd.
Band 3,: Die Untersuch. v.
Futtermitteln. - Verlag Neumann,
Radebeul. |
| Miller, D.S. and
Bender, A.E.: | 1955 | Brit. J. Nutr. <u>9</u> , 382. |
| Miller, S. u.
Ruttinger, V.: | 1950 | Archiv Biochem. <u>27</u> , 185: Zit.
nach Höller, R. 1958. |
| Mitchell, H.H.: | 1923/
24 | J. Biol. Chem. <u>58</u> , 873. |
| Mitchell, H.H.: | 1923/
24 | ebenda, <u>58</u> , 905. |
| Mitchell, H.H.: | 1924 | ebenda, <u>58</u> , 923. |
| Mitchell, H.H.: | 1954 | Wiss. Abh. DAL Berlin,
Bd 5/2, 279. |
| Mitchell, H.H.: | 1955 | J. Nutr. <u>55</u> , 193. |
| Mitchell, H.H.: | 1938 | Acad. D'Italia Atti dei
Connegni, 7, Roma I: Zit.
nach Columbus, 1954. |

- | | | |
|---|------|--|
| Mitchell, H.H. and
Carmen, G.G.: | 1926 | J. Biol. Chem. <u>68</u> , 183. |
| Möhler, K. u.
Antonacopoulos, N.: | 1957 | Z. Lebensm. Unters. Forschg.
<u>106</u> , 425. |
| Murayama, S. and
Yanase, M.: | 1962 | in "Fish in Nutrition"
S. 320. |
| Müller, R. u.
Hötzel, D.: | 1957 | Archiv f. Tierern. <u>7</u> , 66. |
| Nehring, K.: | 1952 | Sitzungsber. DAL Berlin,
Bd. 1/11. |
| Nehring, K.: | 1956 | Deutsch. Fisch. Z. <u>3</u> , 7, 211. |
| Nehring, K.: | 1960 | "Agrikulturchemische Untersu-
chungsmethoden für Dünge- und
Futtermittel, Böden und Milch!"
Verlag Paul Parey - Hamburg -
Berlin. Ca: S. 94; P: S. 162
u. v.RP: S. 147. |
| Nehring, K. u.
Schröder, I.: | 1959 | Archiv f. Tierern. <u>9</u> , 305. |
| Nehring, K. u.
Schwerdtfeger, E.: | 1954 | Wiss. Abh. DAL Berlin Bd 5/2,
355 |
| Neilands, J.B.;
Sirny, R.J.;
Sohljell, J.;
Strong, F.M. and
Elvehjem, C.A.: | 1949 | J. Nutr. <u>39</u> , 187. |
| Neumann, K.: | 1955 | "Grundriß der Gefriertrock-
nung". Musterschmidt, wis-
senschaftlicher Verlag. |
| Neuman, R. u.
Logan, M.: | 1950 | J. Biol. Chem. <u>184</u> , 299:
Zit. nach Antonacopoulos, N.
1957. |
| Njaa, L.R.: | 1959 | Brit. J. Nutr. <u>13</u> , 137. |

- | | | |
|--|------|--|
| Njaa, L.R.: | 1959 | Brit. J. Nutr. <u>13</u> , 142. |
| Njaa, L.R.: | 1962 | ebenda, <u>16</u> , 185. |
| Njaa, L.R.: | 1963 | "A study on the Mitchell
methode for dètermination of
the biological value of
Protein" in Reports on
Technol. Res. Conc. Norw.
Fish. Industr. IV, 5. - A.S.
John Griegs Boktrykkeri -
Bergen. |
| Olley, J. and
Watson, H.: | 1961 | J. Sci Food Agric. <u>12</u> , 316. |
| Osborne, T.B.;
Mendel, L.B. and
Ferry, E.J.: | 1919 | J. Biol. Chem. <u>37</u> , 223: Zit.
nach Mitchell, H.H. 1954. |
| Oser, B.L.: | 1951 | J. Amer. Diet. Assoc. <u>27</u> ,
396: Zit. nach Mitchell, H.H.
1954. |
| Ousterhaut, L.E.;
Grau, C.R. and
Lundholm, B.D.: | 1959 | J. Nutr. <u>69</u> , 65. |
| Ousterhaut, L.E. and
Snyder, D.G.: | 1962 | in "Fish in Nutrition" S. 303, |
| Portner, O. u.
Högel, O.: | 1953 | Anal. Chem. Acta <u>8</u> , 29: Zit.
nach Höller, R. 1958. |
| Prescott, J.M.;
Schweigert, B.S.;
Lyman, C.M. and
Kuiken, K.A.: | 1958 | J. Biol. Chem. <u>178</u> , 727:
Zit. nach Höller, R. 1958. |
| Rippon, W.P.: | 1959 | Brit. J. Nutr. <u>13</u> , 243. |
| Rama Rao, P.B.;
Metta, V.C. and
Johnson, B.C.: | 1959 | J. Nutr. <u>69</u> , 387. |

- | | | |
|---|------|---|
| Rubner: | 1897 | im Handbuch der Ernährungs-
therapie: Zit. nach
Thomas, K. 1909. |
| Rupe, C.O. and
Farmer, C.H.: | 1955 | J. Biol. Chem. <u>213</u> , 899. |
| Sanger, F.: | 1945 | Biochem. J. <u>39</u> , 507. |
| Sanger, F.: | 1949 | ebenda, <u>45</u> , 563. |
| Schönheimer, R.;
Ratner, S. u.
Rittenberger, | 1939 | J. Biol. Chem. <u>130</u> , 703. |
| Schönheimer, R.: | 1942 | The dynamic state of body
constituents, Cambridge,
Mass: Harvard Univ. Press. |
| Souci, S.W.;
Fachman, W. u.
Kraut, H.: | 1962 | "Die Zusammensetzung der Le-
bensmittel. Nährwert-Tabel-
len I", Wissenschaftliche
Verlagsgesellschaft m.b.H.,
Stuttgart. |
| Spies, J.R. and
Chambers, D.C.: | 1948 | Analyt. Chem. <u>20</u> , 30. |
| Spies, J.R. and
Chambers, D.C.: | 1949 | ebenda, <u>21</u> , 1249. |
| Stansby, M.E.: | 1961 | in "Fish in Nutrition". |
| Stockes, J.L.;
Gunnes, M.;
Dwyer, I.M. and
Caswell, M.C.: | 1945 | J. Biol. Chem. <u>160</u> , 35: Zit.
nach Höller, R. 1958. |
| Thomas, K.: | 1909 | Archiv Anat. Physiol. (physiol.
Abt.) 25, 219. |
| Tomarelli, R.M.;
Ninnick, N.;
D'Amato, E. u.
Bernhart, F.W.: | 1959 | J. Nutr. <u>68</u> , 265. |

- | | | |
|-------------------------------------|------|--|
| Weber, E.: | 1964 | "Grundriß der biologischen Statistik", Gustav Fischer Verlag, Jena. |
| Wierbicke, E. u.
Deatherage, F.: | 1954 | J. Agric. Food Chem. <u>12</u> , 878:
Zit. nach Antonacopoulos, N.
1957. |
| Winkler, S.: | 1934 | Hoppe - Seyler's Z. physiol.
Chem. <u>228</u> , 50: Zit. nach
Antonacopoulos, N. 1957. |
| Winter, H.: | 1957 | Z. Lebensm. Unters. u.
Forschg. <u>105</u> , 200. |
| Woolley, J.G. and
Sebrell, W.H.: | 1945 | J. Biol. Chem. <u>157</u> , 141:
Zit. nach Höller, R. 1958. |
| Zimmermann, G.: | 1952 | Dissertationsarbeit, Zürich:
Zit. nach Njaa, L.R. 1963. |

L e b e n s l a u f

Am 2. 5. 1938 wurde ich, Esam Kamel Moustafa, in Kaliopia (Ägypten) als Sohn des Richters Kamel Moustafa und dessen Ehefrau Zinab El-Yamani geboren.

Von 1943 bis 1959 besuchte ich in Alexandria (Ägypten - VAR) folgende Schulen:

1943 - 1946 Moustafa Pasha Kinderschule

1946 - 1950 Ramleh Primary School (Volksschule)

1950 - 1955 Ramleh Secondary School (Gymnasium)

Im Juni 1955 bestand ich das Abitur.

Von 1955 - 1959 studierte ich an der landwirt. Fakultät (Alexandria Universität) und bestand im Juni 1955 das Abschlußexamen (B. Sc. Agric./ Food Technology).

Von September 1959 bis April 1961 leistete ich meinen Wehr-Pflichtdienst in der ägyptischen Marine in Alexandria.

Von April bis September 1961 war ich als Unterrichts - Assistent am Institut für Lebensmittel-Verarbeitung der landw. Fakultät in Alexandria tätig.

Ab Oktober 1961 erhielt ich von der ägyptischen Regierung ein Stipendium, um in der Bundesrepublik Deutschland mein Studium fortzusetzen.

Von Oktober 1961 bis Februar 1962 habe ich am Goethe-Institut in Brilon-Stadt/Westf. die deutsche Sprache erlernt.

Seit November 1962 bin ich an der Justus Liebig Universität Gießen immatrikuliert und zwar als Doktorand am Institut für Tierernährung.

Im November 1963 habe ich gemäß den Bestimmungen der landwirt. Fakultät, die Ergänzungsprüfung abgelegt.

